

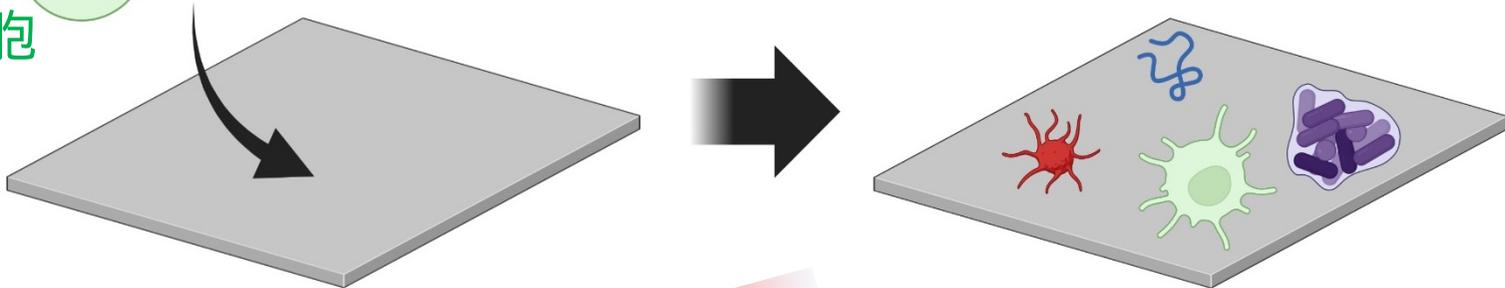
コラーゲン骨格模倣オリゴペプチドを利用した 新規アンチバイオフィアウリング表面の構築

関西大学 化学生命工学部 化学・物質工学科
教授 柿木 佐知朗

2023年8月31日

タンパク質
血小板
細菌
細胞

吸着・粘着・接着
バイオフィアリング



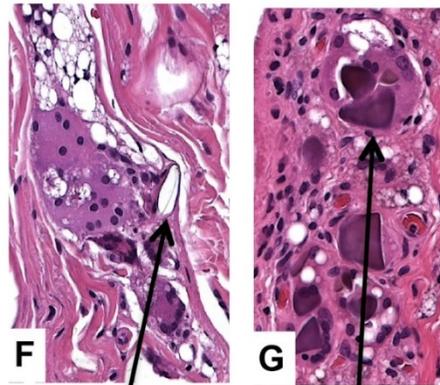
感染症

炎症

血栓



Semin. Vasc. Surg.,
24(2011)220



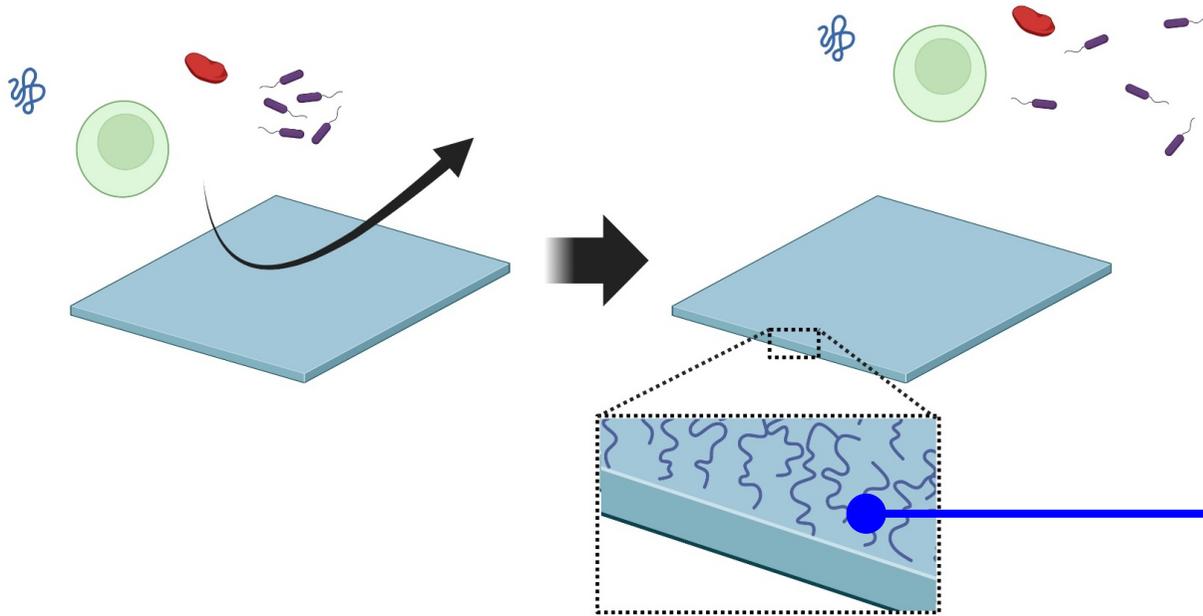
silicone polyurethane
PLoS ONE 12(7): e0181097.



J. Vasc. Surg.,
40(2004)803.

バイオフィウリングを防ぐ

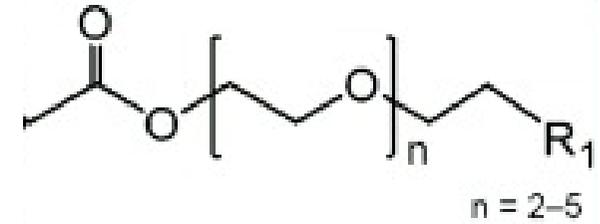
→ 合併症を回避



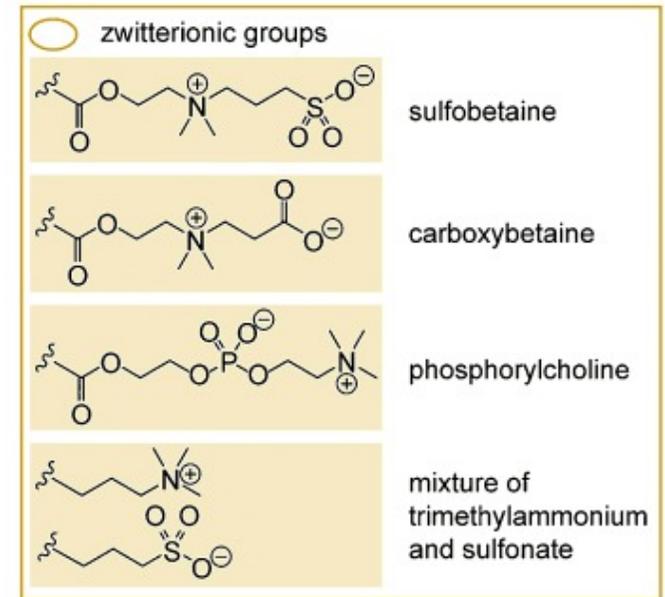
アンチバイオフィウリング分子 で

基材の表面を修飾する。

Anti-biofouling macromolecules



Poly(ethylene glycol) [PEG]



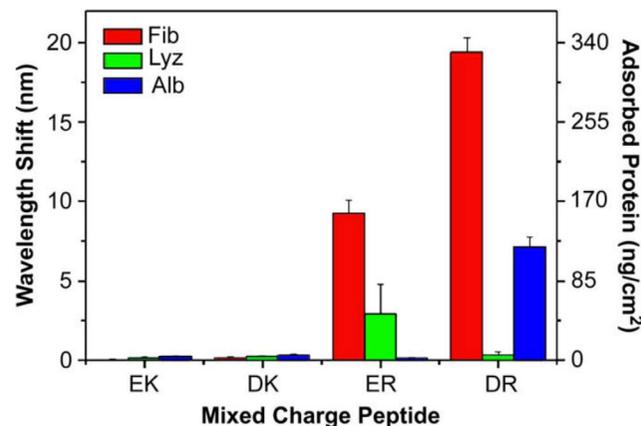
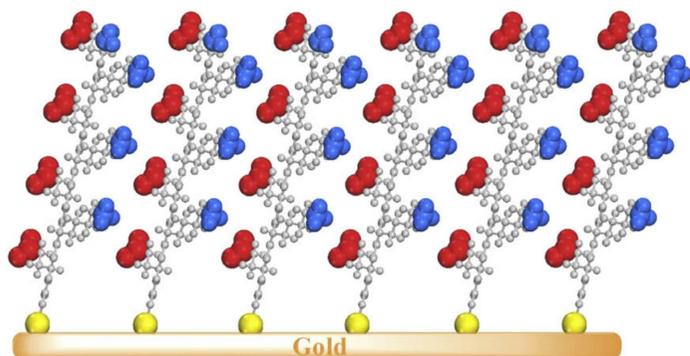
Zwitterionic polymers

従来技術の問題点: 合成高分子材料なので使用が制限される。
(例: PEGの抗原性など)

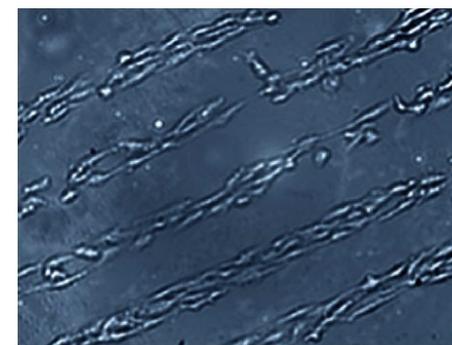
最近の研究動向

アミノ酸(生体由来分子)で構成されるアンチバイオフィウリング分子

Peptide sequence	Category	Ref.
Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Lys-Glu Asp-Lys-Asp-Lys-Asp-Lys-Asp Glu-Arg-Glu-Arg-Glu-Arg-Glu Asp-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Asp	Twitterionic	<i>Biomaterials</i> ,30(2009)5892
His-His-Asp-Asp-His-His	Hydrophilic	<i>Anal.Chem.</i> ,86(2014)9612
Phe(4-F)-Phe(4-F)-Phe(4-F)-Lys-Lys-Lys	Amphiphilic	<i>ACS Biomac.</i> ,19(2018)3620
Glu-Glu-Ser-Lys-Ser-Glu-Ser-Lys-Ser	Twitter ionic Hydrophilic	<i>ACS Sensors</i> ,2(2017)490



Bovine aortic endothelial cells



Shaoyi Jiang et al., *Biomaterials*,30(2009)5892

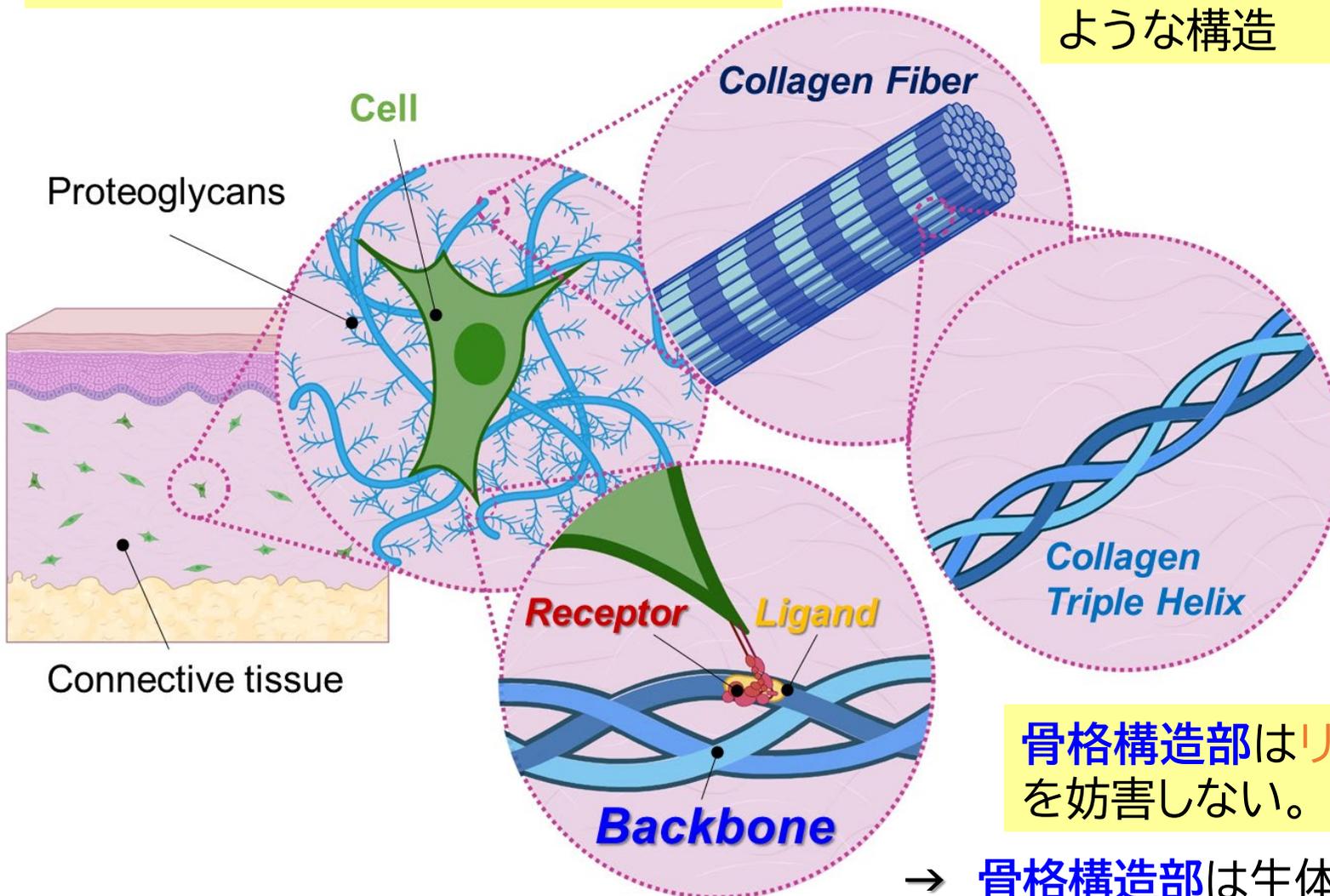
両イオン性ペプチドや両親媒性ペプチドが広く研究されている。

本技術の開発戦略

コラーゲン骨格の模倣によるアンチバイオフィウリングペプチド

細胞は主にコラーゲンで構成される細胞外マトリクスを足場として機能

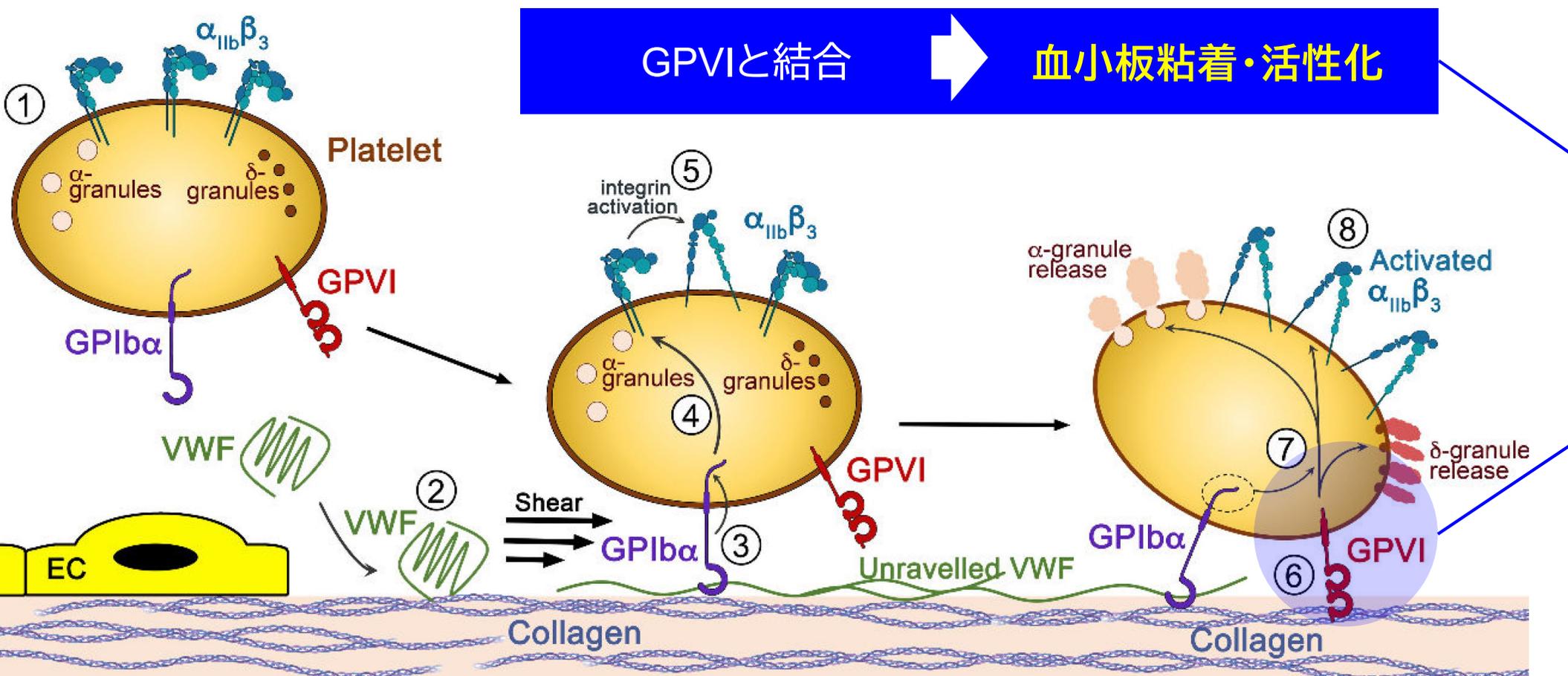
コラーゲンは、受容体が認識するリグاند配列が大きな骨格構造部に点在するような構造



骨格構造部はリグاند-受容体相互作用を妨害しない。

→ 骨格構造部は生体分子と相互作用しにくい？

- コラーゲン様ペプチド((Gly-Pro-Hyp)_n)は血小板を粘着・活性化する。
- 一般的にヒドロキシ基(Hypが側鎖に含む)は補体の活性化を誘導する。
- コラーゲン様ペプチドは、医療応用を目指したアンチバイオフィアウリングペプチドとして好ましくない。



本技術 コラーゲン骨格模倣ペプチド『オリゴプロリン』

Triple helix

Backbone

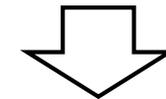
(L) = Ligands (RGD, GFOGER etc.)



-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-

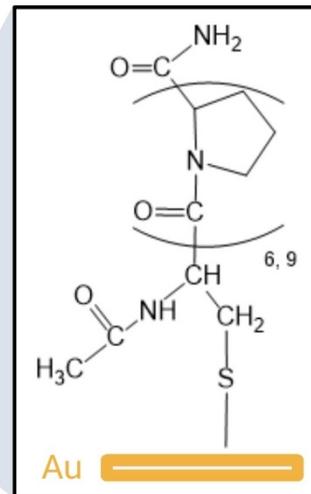
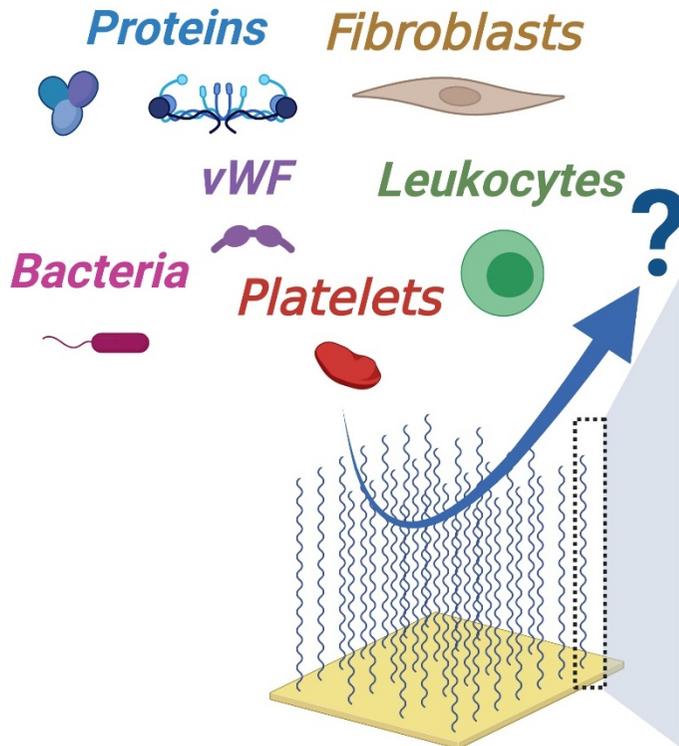
Single chain

Poly proline-II helix



Simplification

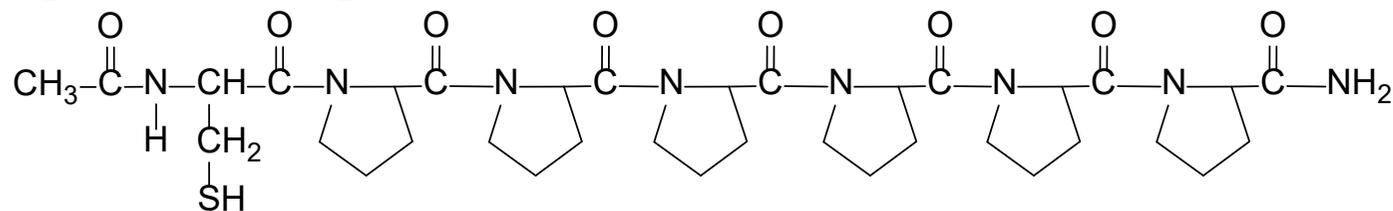
Oligo proline : (Pro)_n



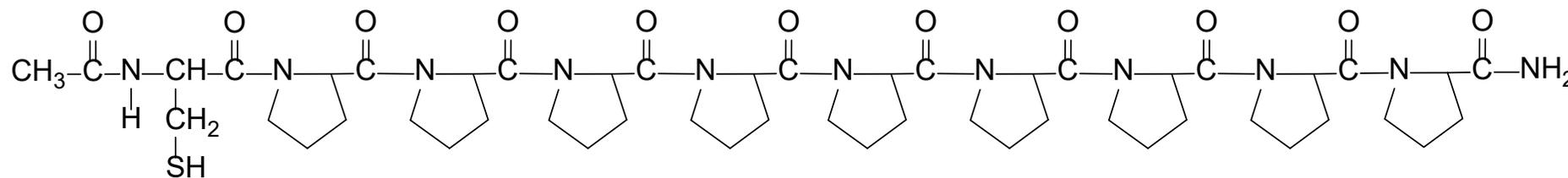
オリゴプロリン固定化界面が
アンチファイリング性を示すか？

オリゴプロリン(Pro6, Pro9)の二次構造解析

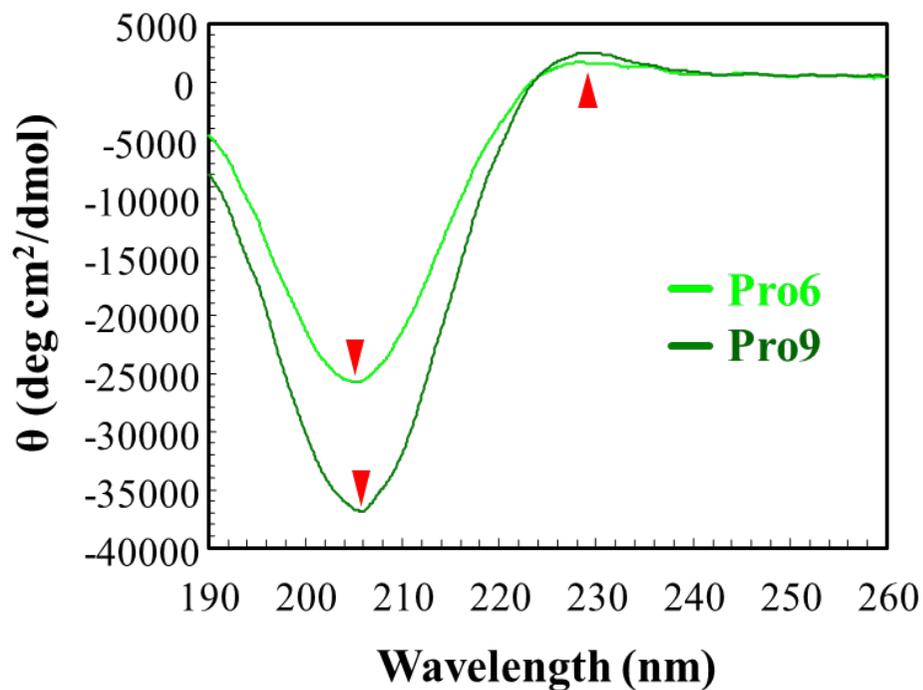
Pro6 [Mw: 744.91]



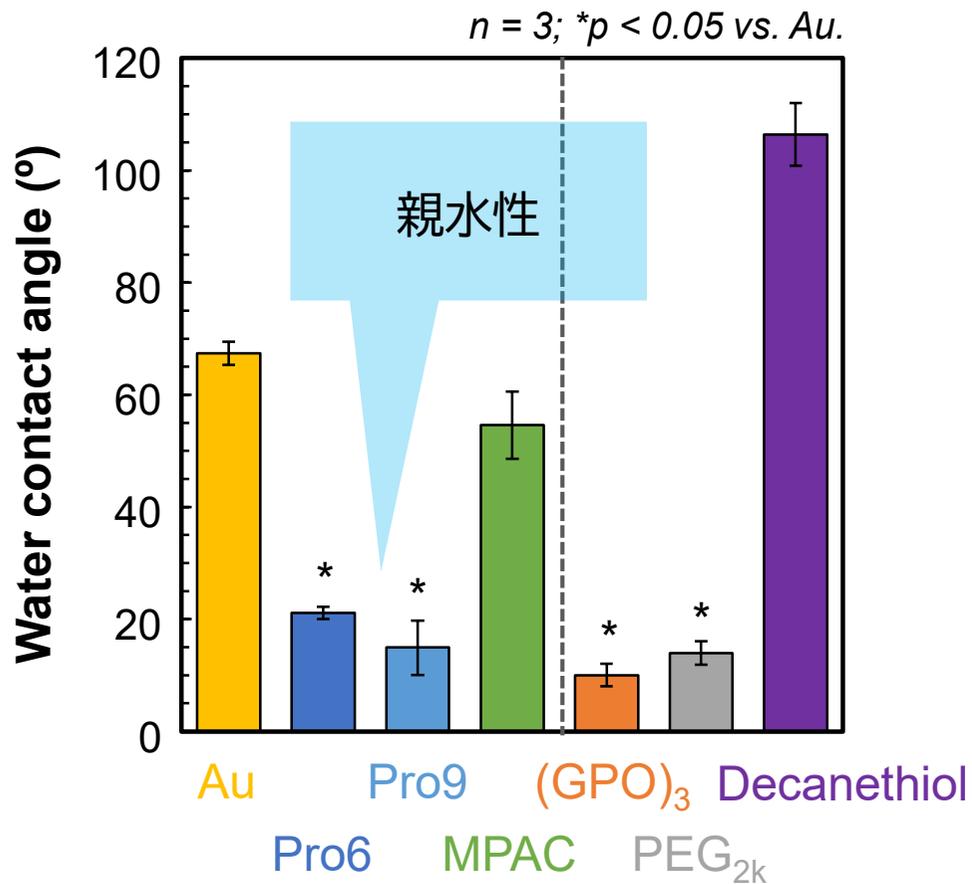
Pro9 [Mw: 1036.26]



オリゴプロリン(Pro6, Pro9)の
CDスペクトル



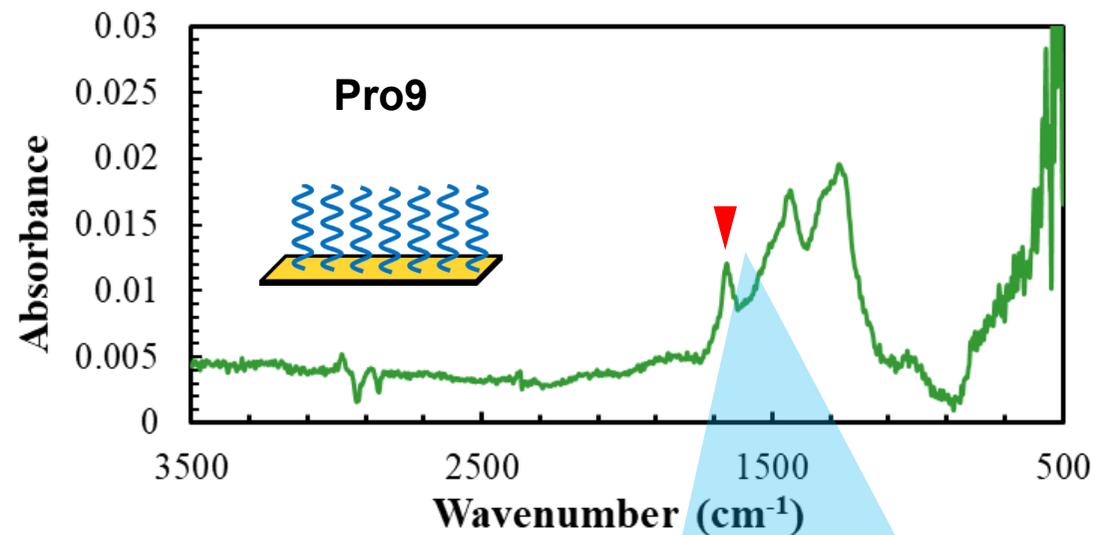
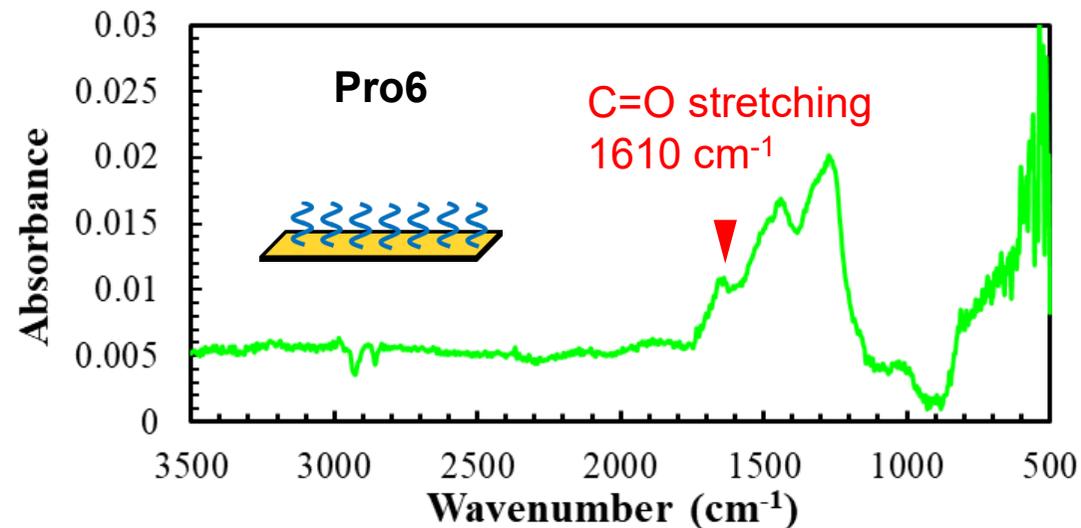
オリゴプロリン固定化表面(金基板)の解析



MPAC [Aminated surface]
(3-mercaptopropyl) ammoniumchloride

NCCCCS · HCl

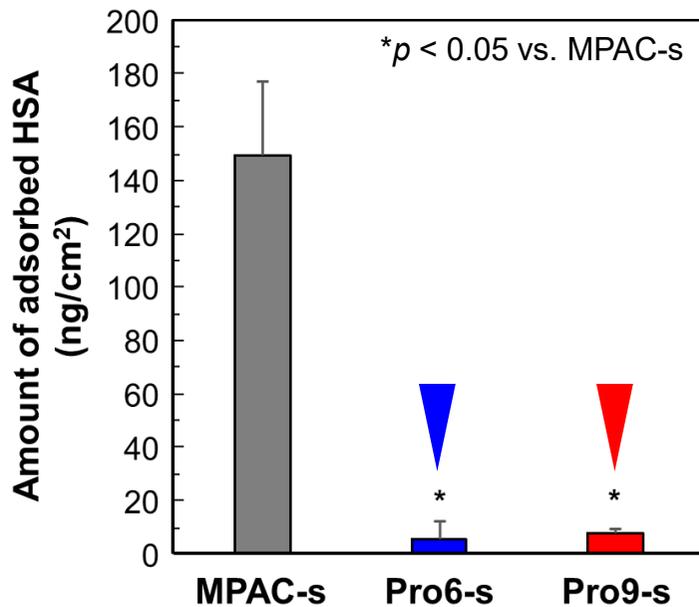
Sample	Surface molecular density	
	(ng mm ⁻²)	(chains per nm ²)
MPAC-s	0.08 ± 0.04	0.39 ± 0.20
Pro6-s	0.42 ± 0.10	0.34 ± 0.08
Pro9-s	0.72 ± 0.02	0.42 ± 0.01



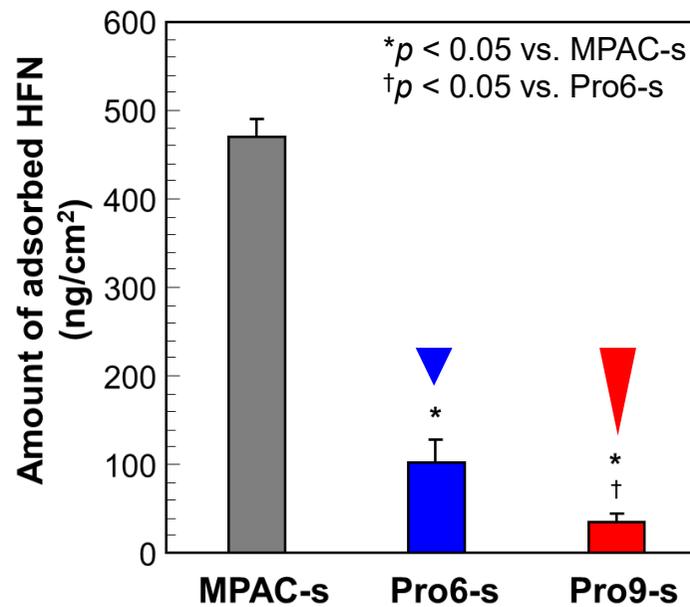
オリゴプロリンは、固定化表面上でも
ポリプロリン-IIヘリックスを形成

血漿タンパク質の吸着 (QCM-d)

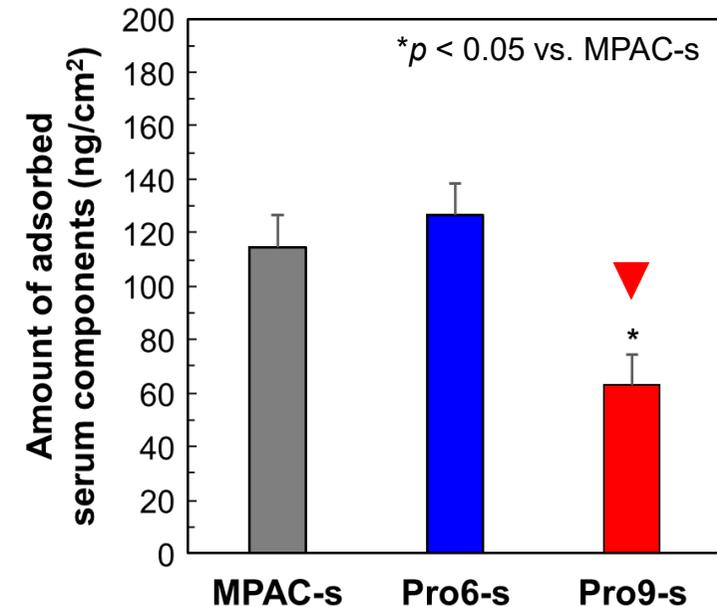
(A) 3.0% human serum albumin (HSA)



(B) 0.3 mg/ml human fibrinogen (HFN)

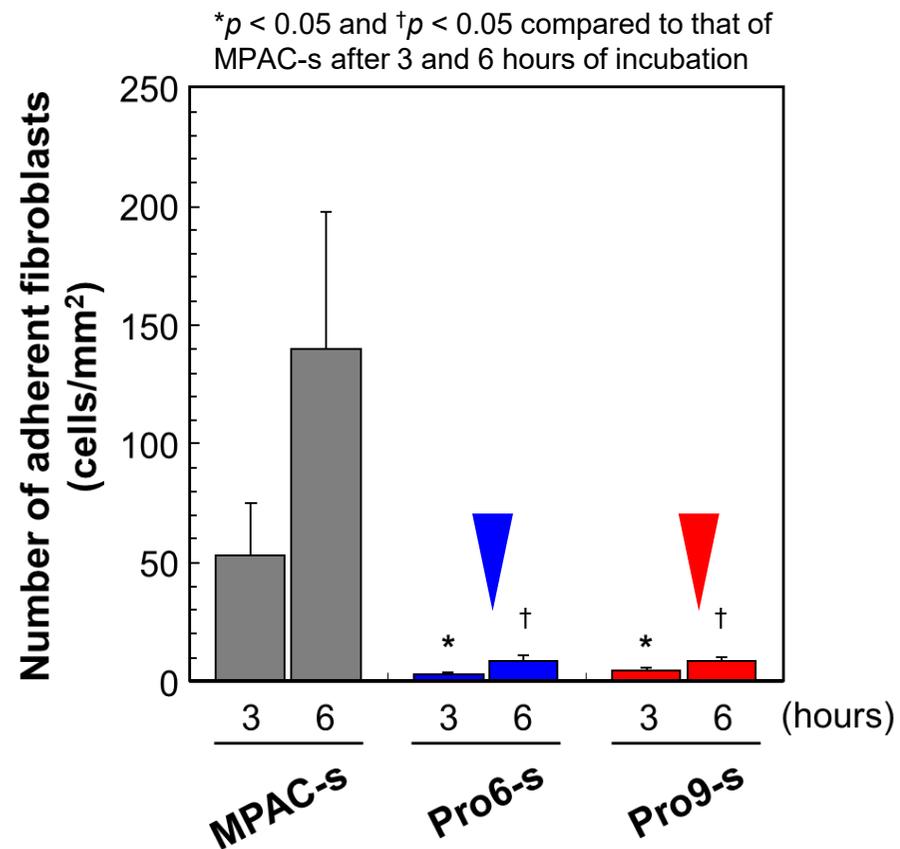
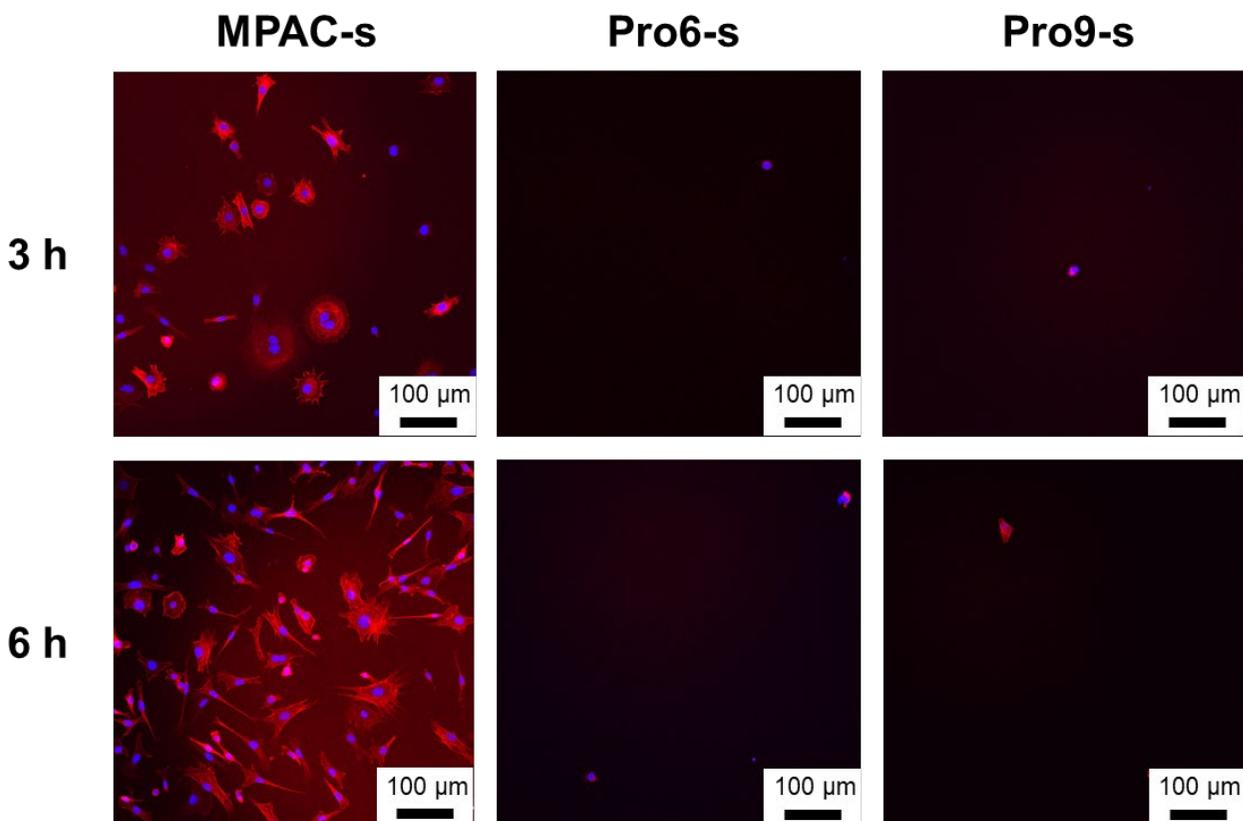


(C) 10% fetal bovine serum



オリゴプロリン(特にPro9)を固定した表面ではタンパク質や血清成分の吸着が抑制された。

線維芽細胞(NIH/3T3 clone 5611)の接着

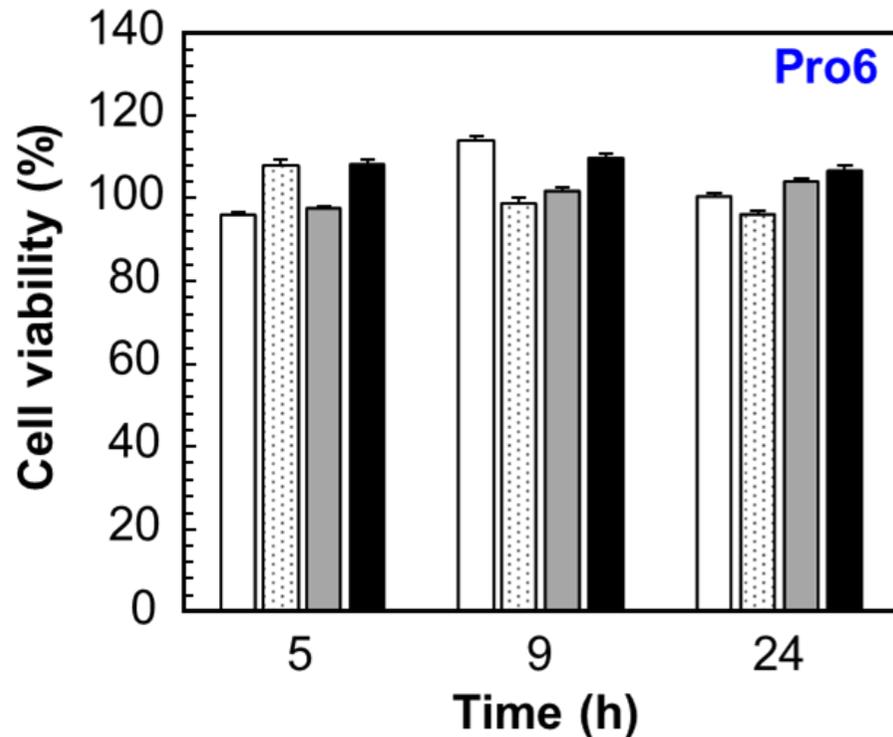


オリゴプロリンを固定した表面には
線維芽細胞はほとんど接着しなかった。

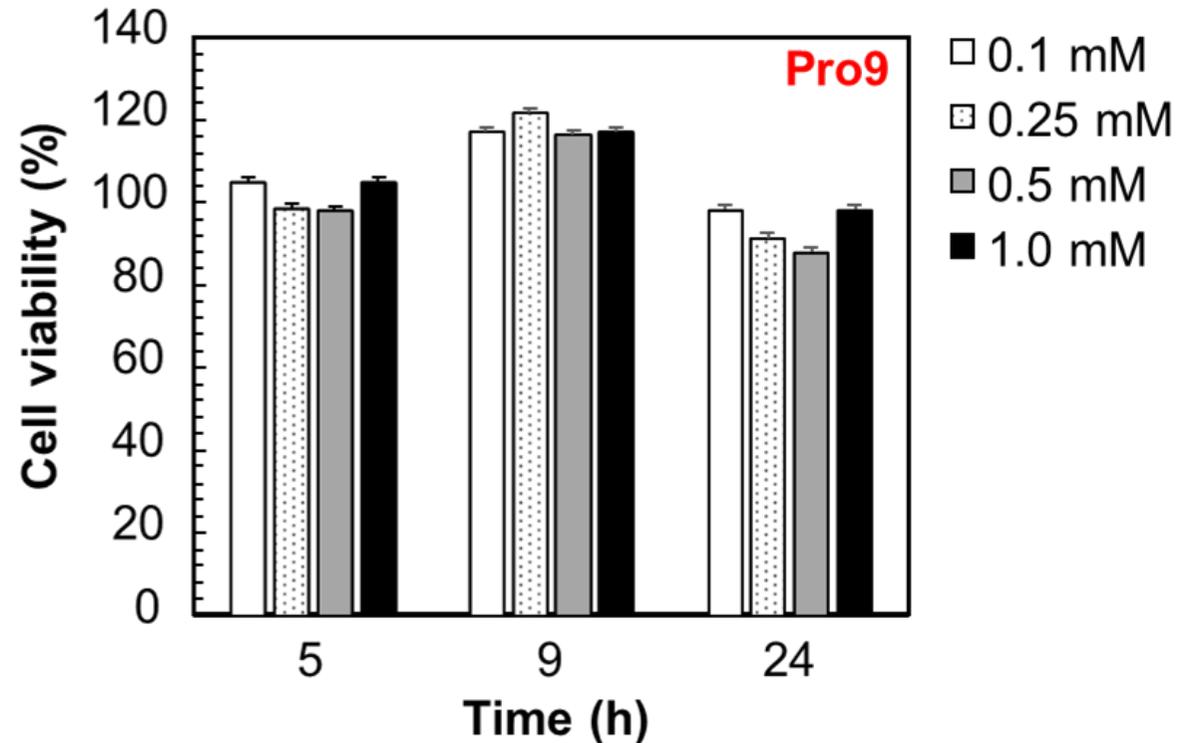
線維芽細胞(NIH/3T3 clone 5611)に対する毒性

オリゴプロリンを添加した培養液中で細胞を培養 → 細胞生存率を測定(WST-1)

(A)

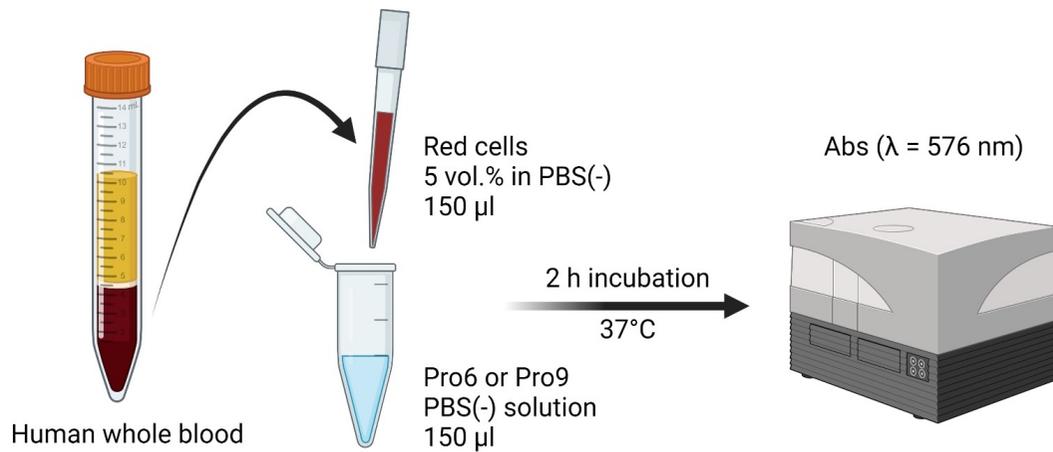


(B)

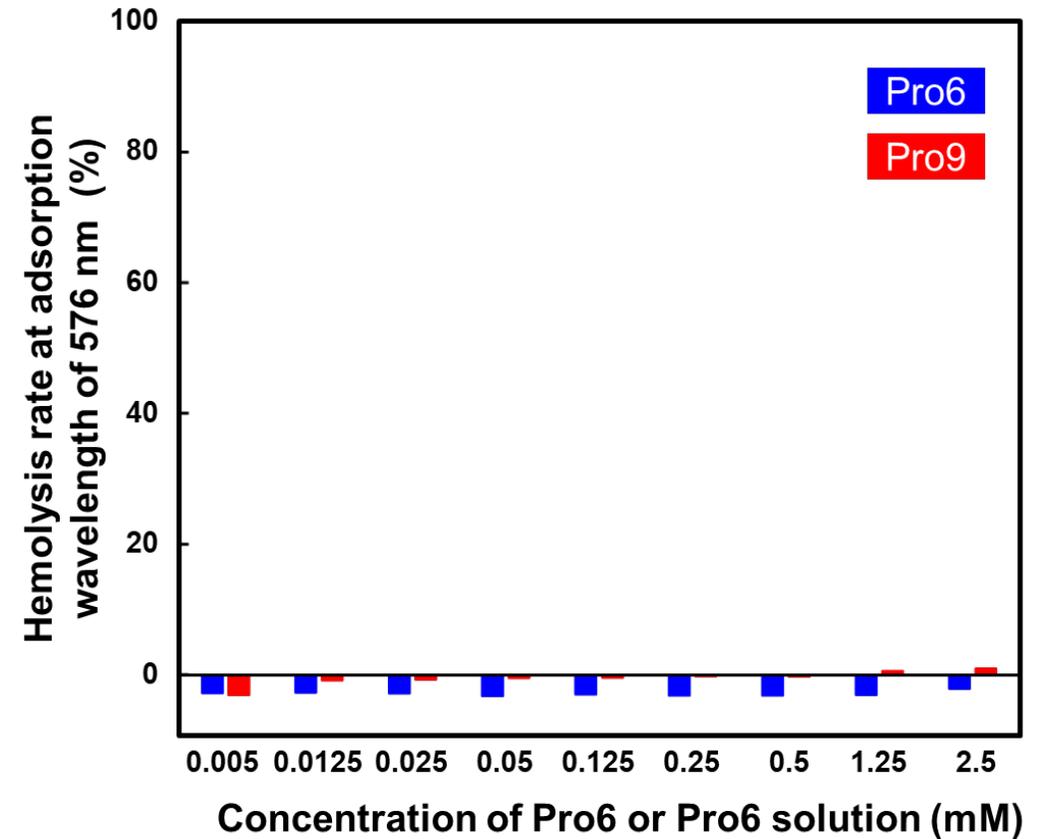


オリゴプロリンは線維芽細胞に対して全く毒性を示さなかった。

ヒト赤血球に対する溶血性



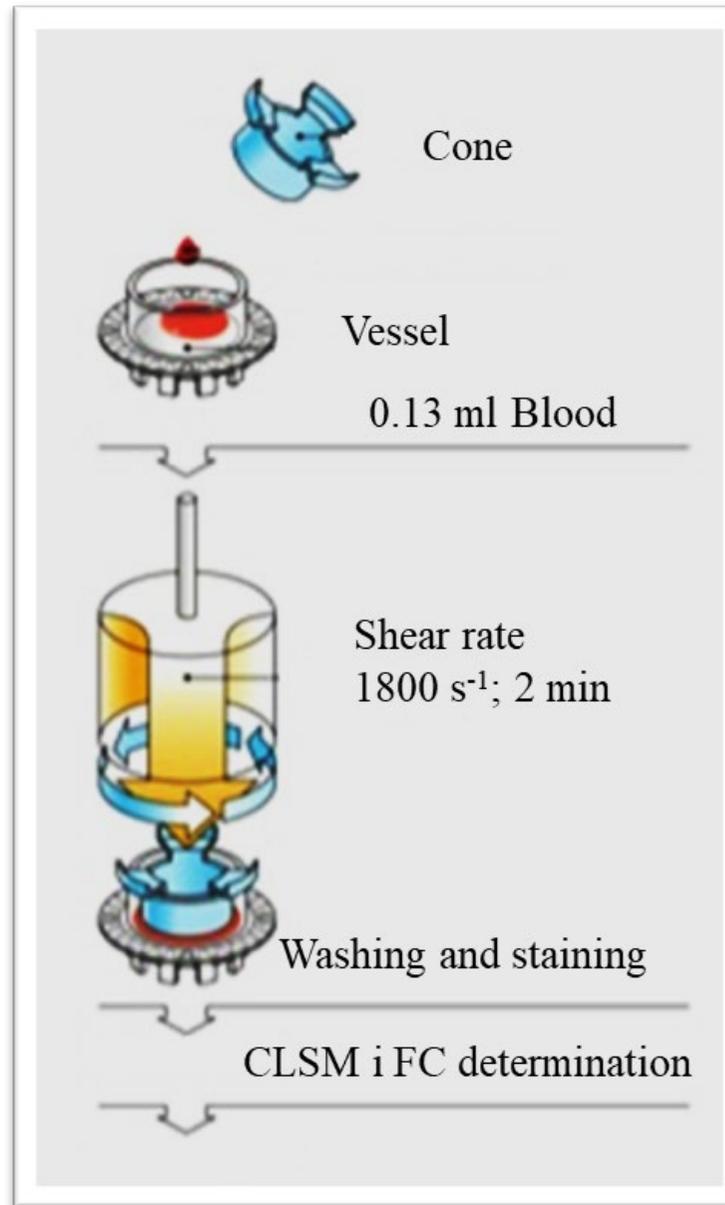
$$\text{Haemolysis (\%)} = \frac{Abs_{\text{peptide/PBS}} - Abs_{\text{PBS}}}{Abs_{1\% \text{ Triton/PBS}} - Abs_{\text{PBS}}}$$



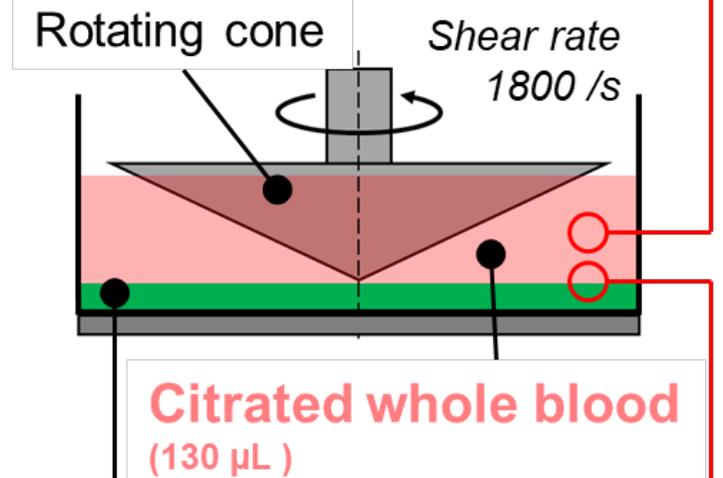
オリゴプロリンは溶血性を全く示さなかった。

In vitro 動的環境下における全血接触試験

Impact-R
(DiaMed AG, Switzerland)



Contacted platelets Activation of GPIIb/IIIa
Secretion of microparticles



Test material

- Polyurethane/Bionate 80A (PU)
- Au-coated cover slip (Au)
- Polystyrene (Blank and ADP)
- Pro6-SAM and Pro9-SAM

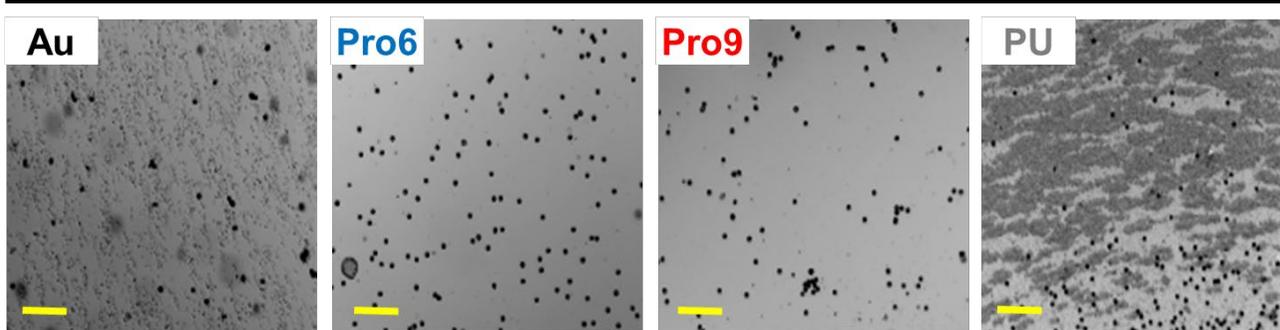
Adhesive elements Blood components
Neutrophils and platelets



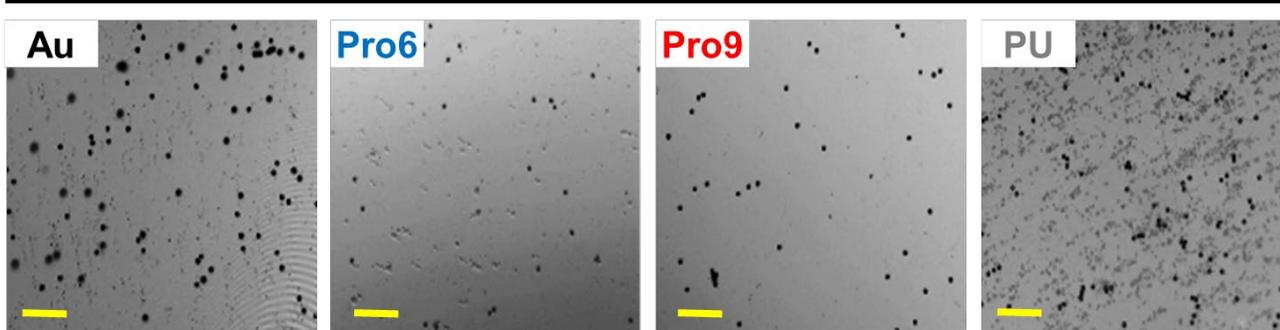
オリゴプロリン固定表面への血球細胞などの接着

試料表面に接着した血球細胞を解析

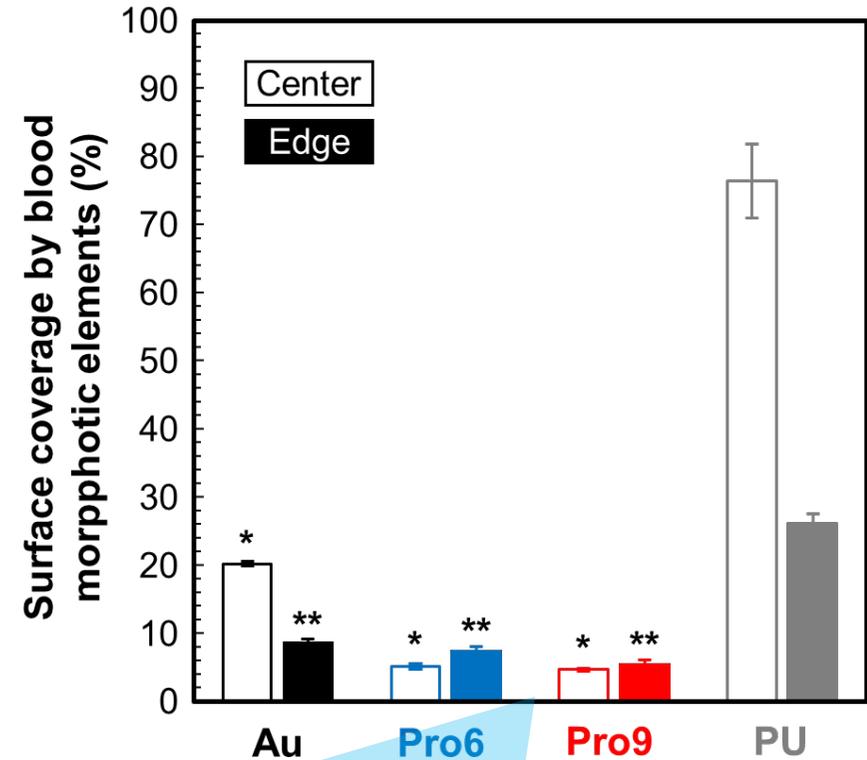
Center



Edge



* $p < 0.05$ vs. PU (center)
** $p < 0.05$ vs. PU (edge)

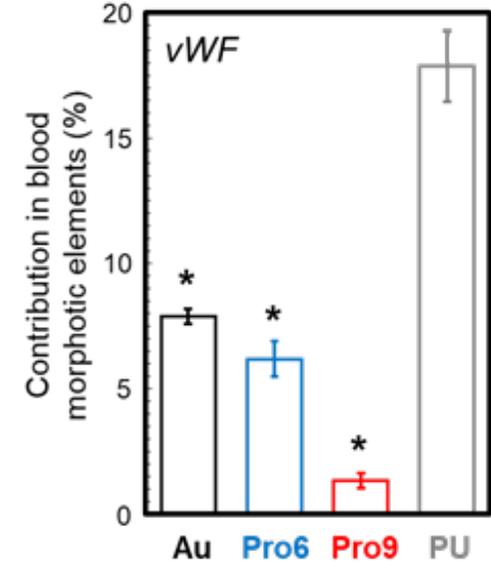
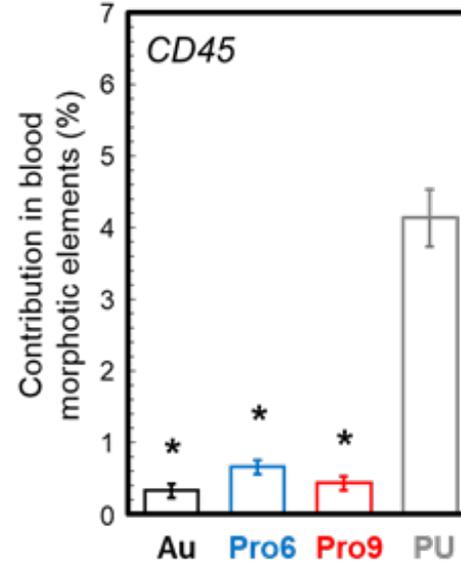
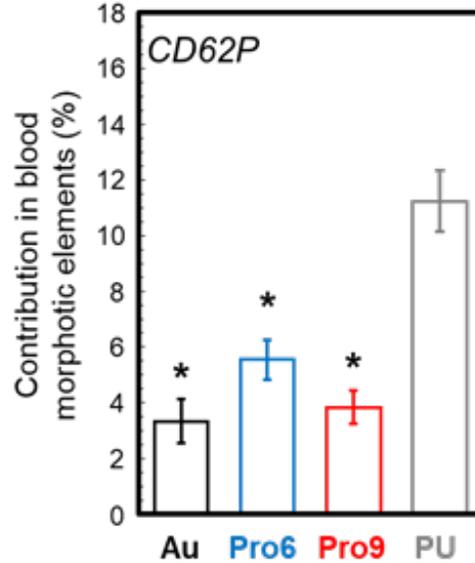


オリゴプロリンを固定化した表面には血球細胞はほとんど接着しなかった。

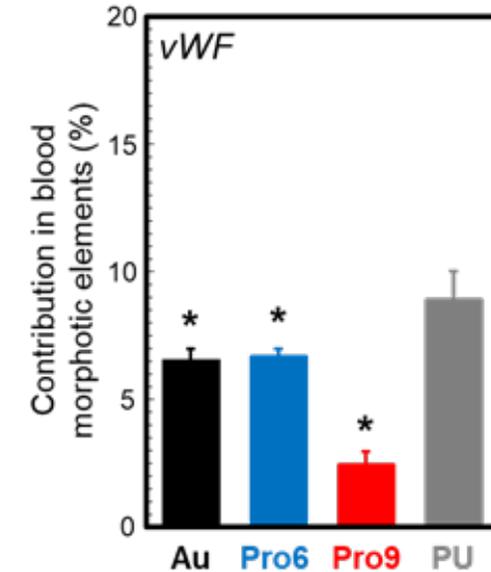
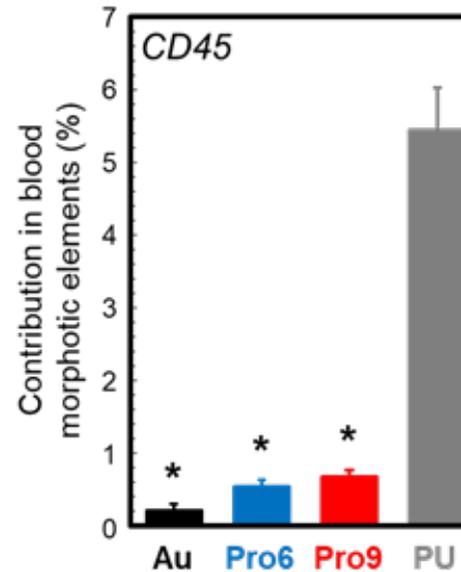
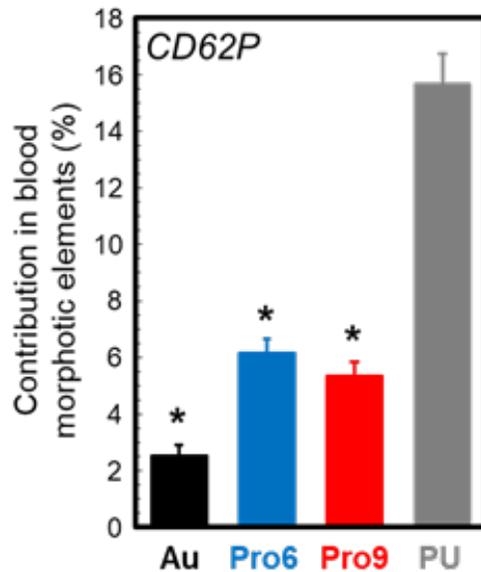
オリゴプロリン固定表面への血球細胞などの接着

試料表面に接着した血球細胞を解析

Center



Edge

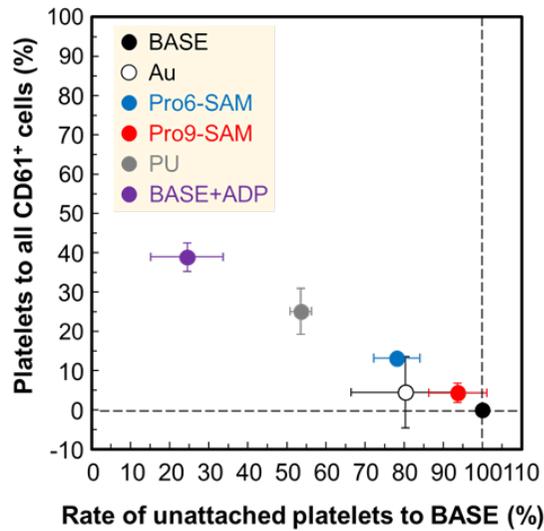


活性化血小板や白血球、vWFはオリゴプロリン固定化表面には接着・吸着しにくい。

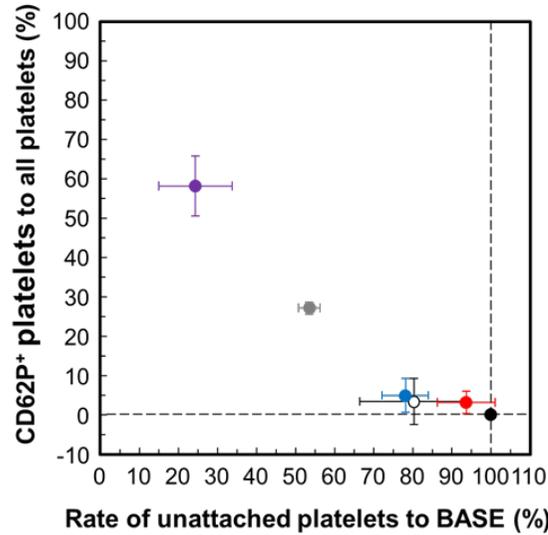
オリゴプロリン固定表面に接触した血小板の活性化

試料表面に接触した血球細胞を解析

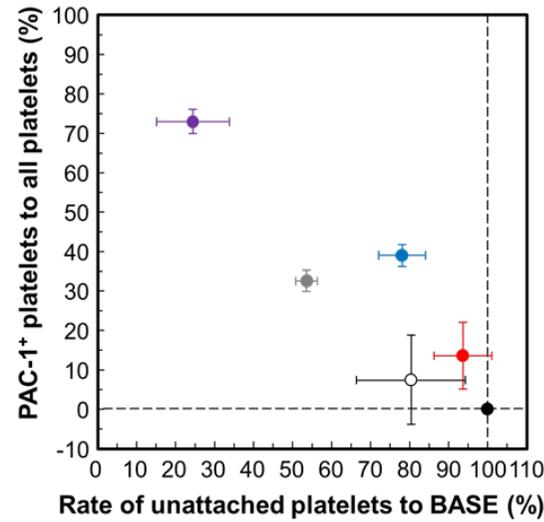
*CD61⁺ platelets,
CD61⁺ monocytes*



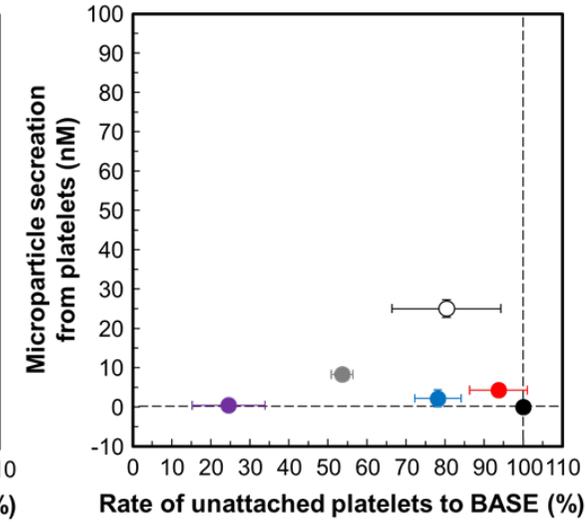
CD62⁺ platelets



PAC-1⁺ platelets

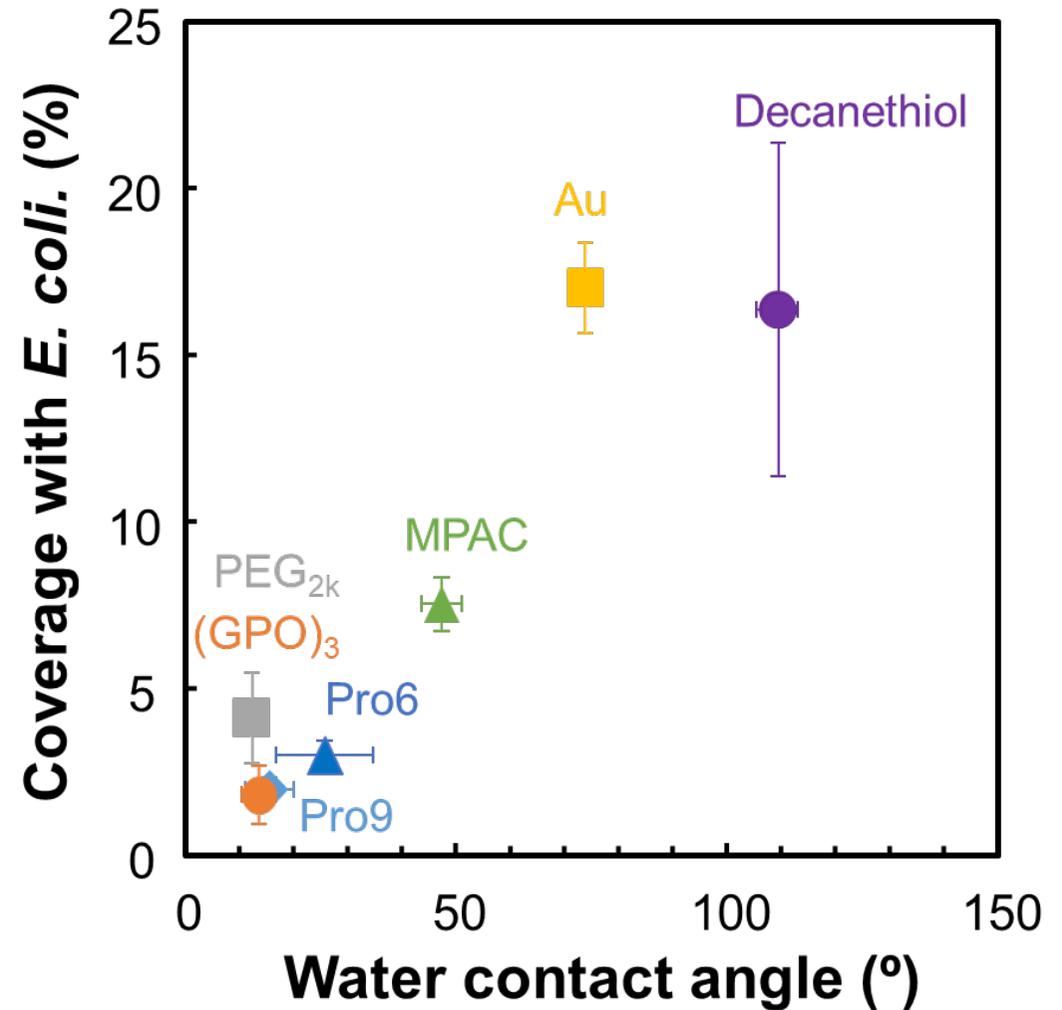
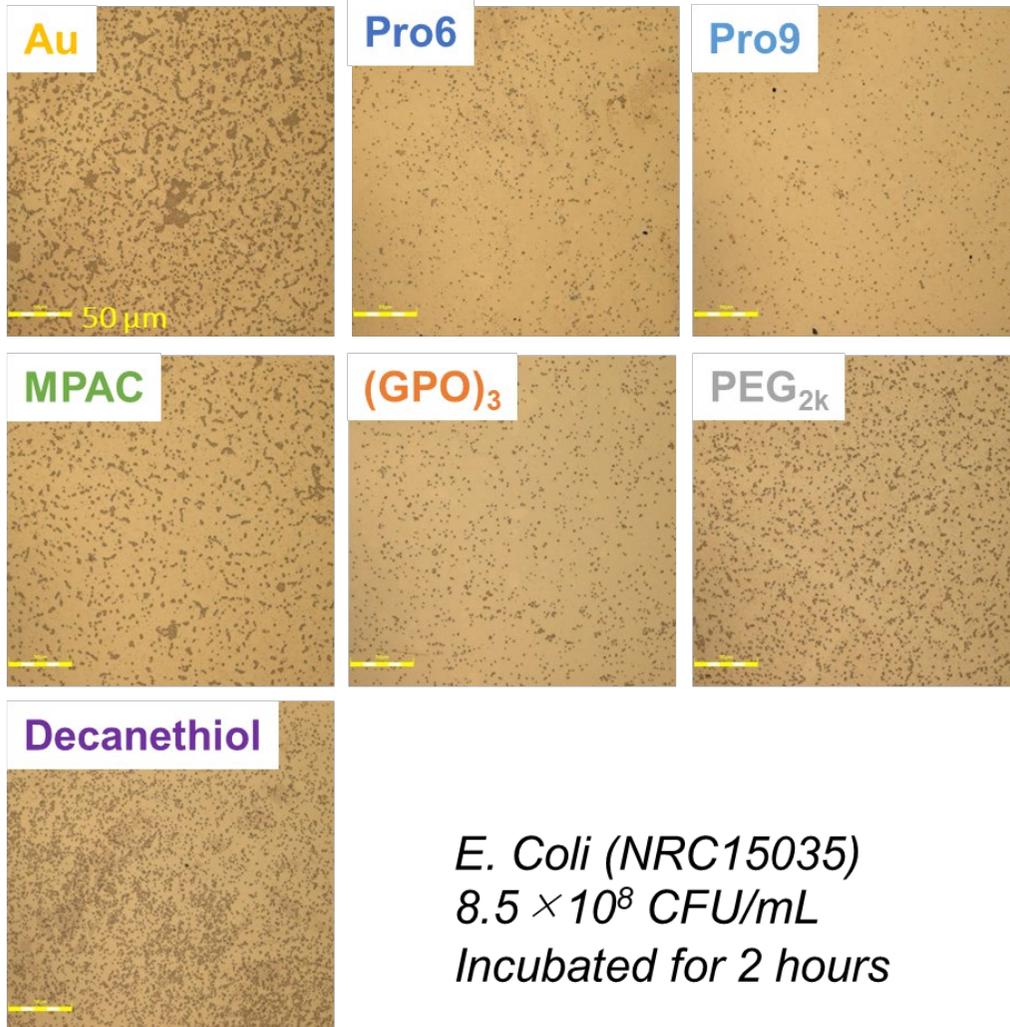


Microparticles



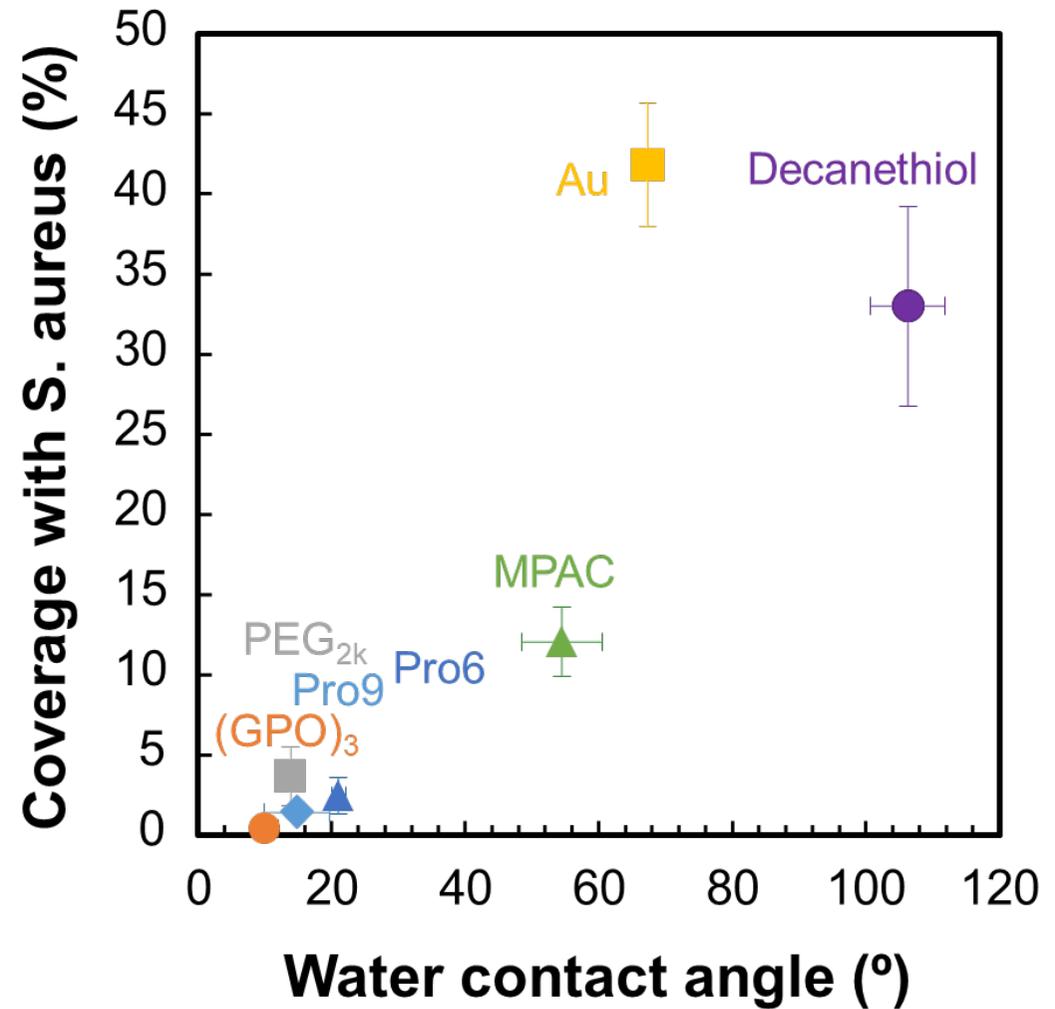
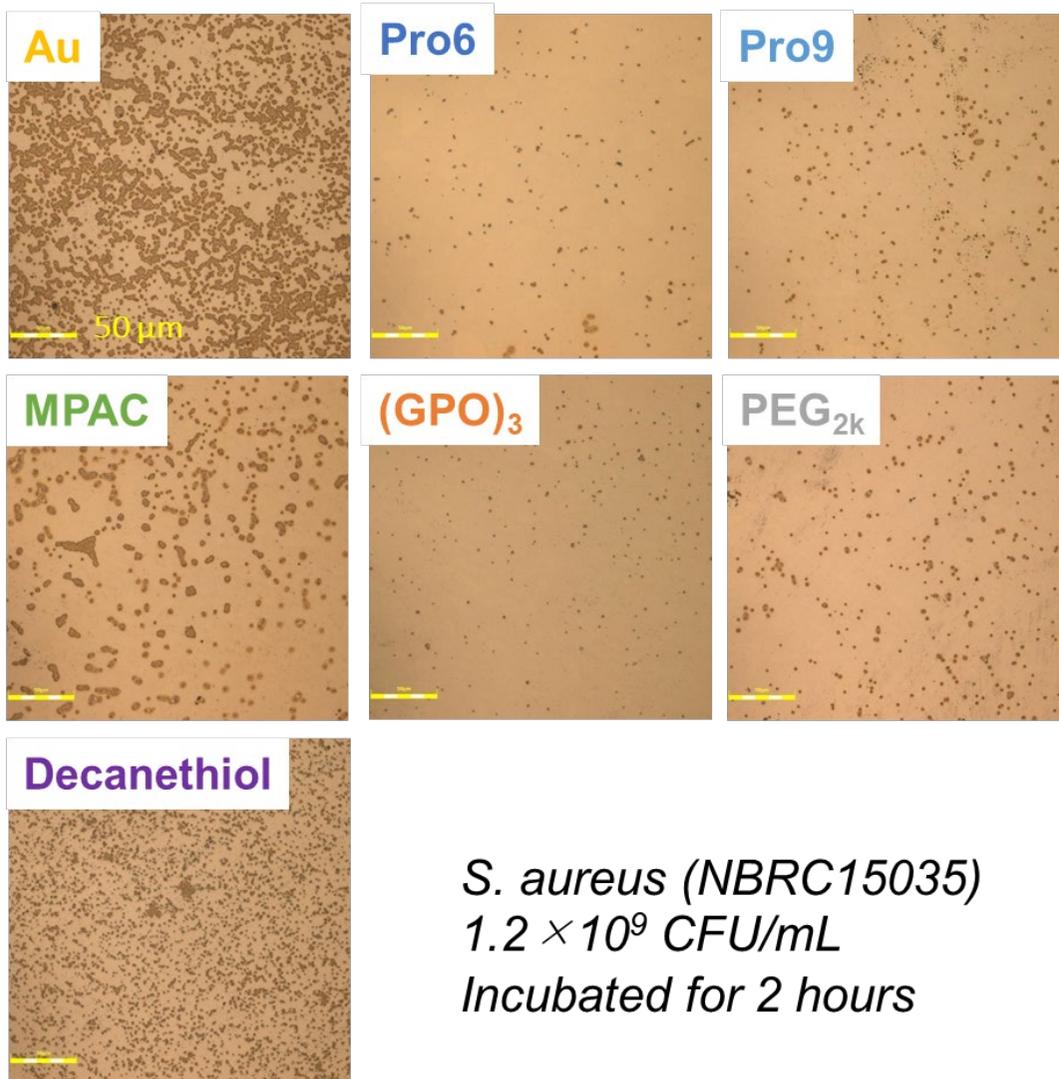
オリゴプロリン固定化表面に接触した血小板は、ほぼ活性化されていない。

大腸菌(グラム陰性菌)の接着



オリゴプロリンは大腸菌の接着を抑制する。

黄色ブドウ球菌(グラム陽性菌)の接着



オリゴプロリンは黄色ブドウ球菌の接着を抑制する。

オリゴプロリン固定化表面のアンチバイオフィアウリング性について考察

カルボニル基がらせん外側へ向く

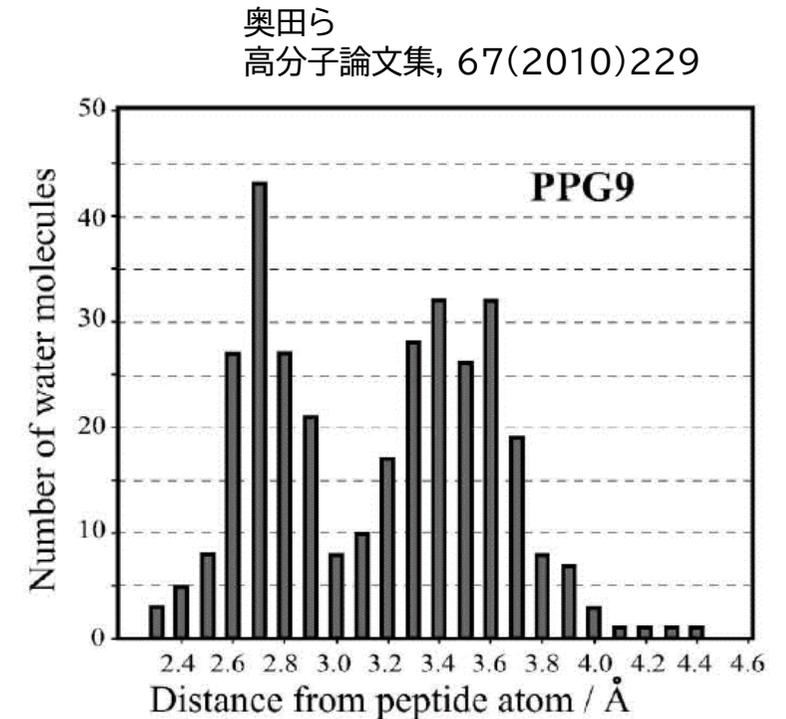
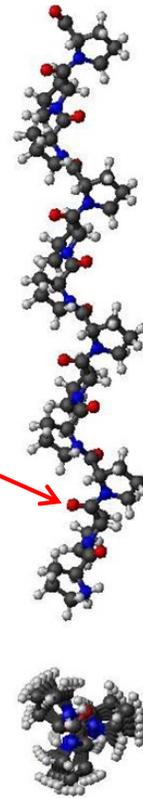


2個の水分子と水素結合(第一層)



その外に水分子が水素結合(第二層)

オリゴプロリンは
水分子の鞘に収まった構造



オリゴプロリンの安定な水和構造形成に基づく
アンチバイオフィアウリング性と予想される。

謝辞



関西大学 化学生命工学部 化学・物質工学科 医工学材料研究室
埜口 友里 修士、松下 夕真 学士



関西大学 化学生命工学部 化学・物質工学科
上田 正人 教授、岩崎 泰彦 教授



Institute of Metallurgy and Materials Science, Polish Academy of Sciences
Prof. Roman Major, Dr. Aldona Mzyk, Dr. Przemyslaw Kurtyka and other researchers

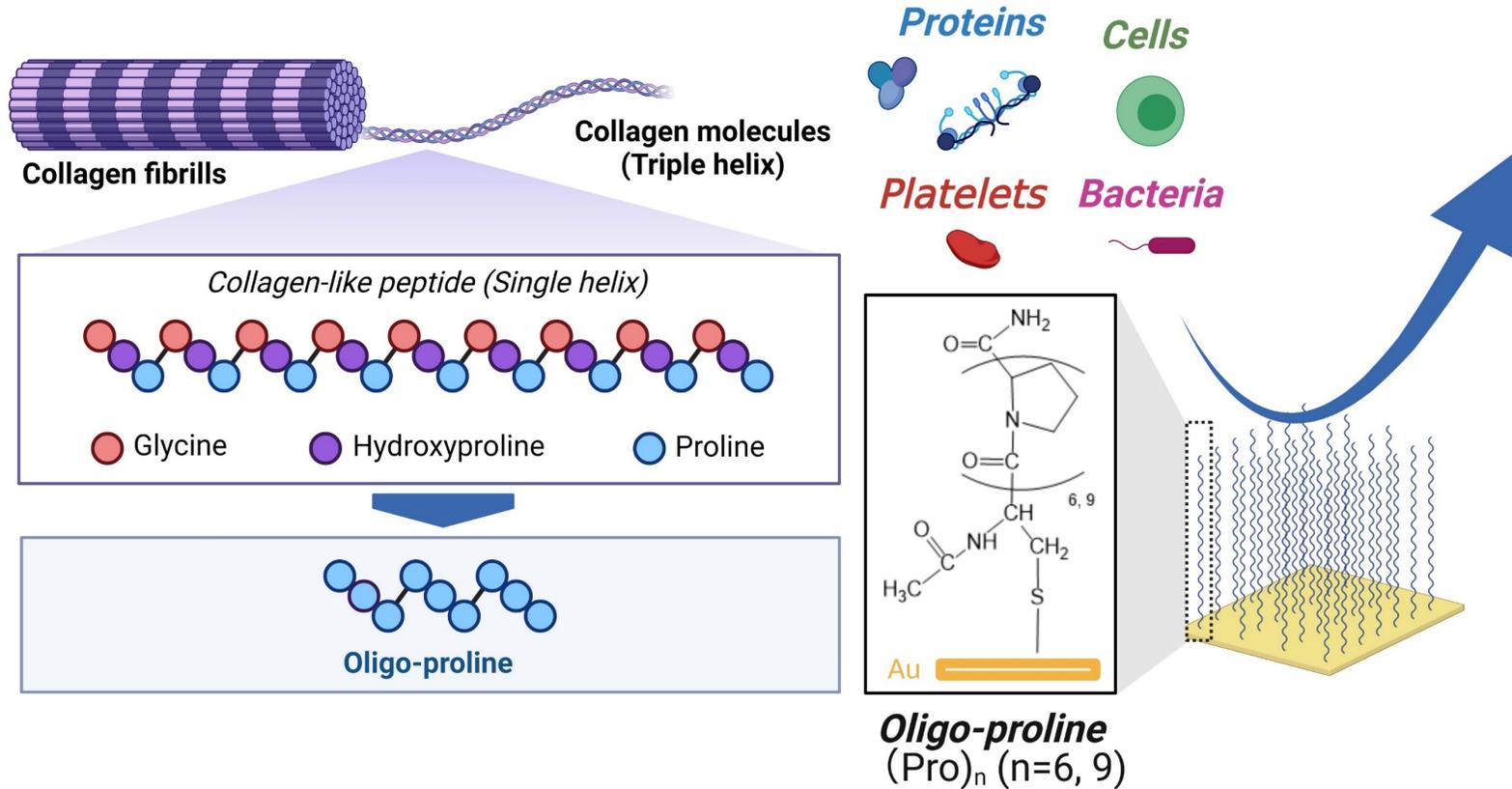


Department of Medicine, Jagiellonian University Medical College
Prof. Marek Sanak and other researchers



公益財団法人
池谷科学技術振興財団

新技術の特徴・従来技術との比較



- 生体由来分子(アミノ酸)で構成されている。→ 高い生体安全性
- タンパク質、細胞、血小板、細菌など、幅広く接着を阻害できる。
- 汎用のペプチド固相法で容易に合成できる。
- 誘導体化によってコーティング剤としても利用できる。【検討中】

想定される用途

- 医療機器への生体分子吸着阻害 → 合併症の回避
- 医療センサーへの生体分子吸着阻害 → S/Nの向上
- コンタクトレンズのタンパク質吸着・凝集阻害
- 歯や歯科用材料のコーティング材 → バイオフィルム
- 体に優しいゼノフリー保湿剤
- 環境に負荷の小さい界面活性剤(高水和分子として) など

実用化に向けた課題

- 幅広い基材に適用できるコーティング技術の開発 → 検討中
- 感作性や生体毒性、代謝性などの詳細な解析
- アンチバイオフィリングメカニズムの解明 など

企業への期待

医療分野によらず、生活用品や化粧品など、従来のアンチバイオフィアウリング分子や親水性分子の代替物質を模索している企業との共同研究を強く希望している。

[現在取り組んでいる研究例]

- オリゴプロリンを様々な基材に簡便にコーティングできる技術を開発中で、克服の目処が立っている。
 - 基材選択性が各段に向上しつつある。
- 界面活性能をもつオリゴプロリン誘導体の合成に成功している。
 - オリゴプロリンは高親水性ペプチドとしても利用できる。

本技術に関する知的財産権

発明の名称 : 血液適合性材料

出願番号 : 特願2021-189676

出願人 : 学校法人関西大学

発明者 : 柿木 佐知朗

お問合せ先

関西大学
産学官連携センター

TEL:06-6368-1245

FAX:06-6368-1247

e-mail:sangakukan-mm@ml.kandai.jp