The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	疾患刺激に応答して細胞増殖因子の徐放を制御する機能性バイオマテリアルの開発
Author(s)	松崎, 典弥; 明石, 満
Citation	バイオインダストリー. 2007, 24(8), p. 56-63
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50608
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

疾患刺激に応答して細胞増殖因子の徐放を制御する機能性バイオマテリアルの開発

Ischemic Disease-sensitive Controlled Release of Growth Factor from Functional Biomaterials

松崎典弥[*1]　明石　満[*2]

スルホン化ポリγ-グルタミン酸のスルホン基とカルボキシル基の割合を制御することで，虚血性疾患（酸性環境）を認識して塩基性繊維芽細胞増殖因子（FGF-2）を徐放し，疾患の回復（中性環境）を認識してFGF-2の徐放を自ら停止する機能性バイオマテリアルの開発に成功した。新しい再生医療用の機能性マテリアルとしてその応用が期待される。

1. はじめに

我が国の三大死因の一つである心筋梗塞は，冠動脈の血流量が低下することで心筋が壊死する虚血性心疾患の一種である。虚血とは，臓器や組織に流入する血液の量が著しく減少した状態を指し，その部位に変性・萎縮・壊死などをきたす症状で，冠動脈以外にも下肢の抹梢血管などでよく起こることが知られている。

薬剤による内科的治療が無効な虚血性疾患に対する従来の治療法として血管再建療法（バイパス手術）が行われてきたが，冠動脈本幹自体が非常に細くなっているため，通常の血管再建療法では細胞レベルでの血流を確保することが困難である。そこで近年，再生医療による血管新生療法が注目されている。血管を構成する細胞の増殖を促進する塩基性繊維芽細胞増殖因子（FGF-2）をアルギン酸ゲルビーズ[1]やゼラチンゲル[2, 3]に含浸して投与することで，徐放されたFGF-2が血管新生を誘導することが動物実験により実証されている。しかし，FGF-2は生体寿命が短く，pHや熱などの外部環境変化により変性しやすいため，マテリアルに安定に担持させることが困難である。また，FGF-2は様々な細胞の増殖や分化を誘導することが知られており，FGF-2の過剰投与は副作用を併発する危険性があるため，必要最小量のFGF-2を変性させることなく徐放制御するシステムの開発が求められている。

筆者らは，FGF-2を安定に担持し，疾患を認識してFGF-2の徐放を自ら制御する機能性バイオマテリアルが開発できれば，虚血性疾患に有効であると考えた。最近の研究で，虚血性疾患部位や炎症部位はpHが弱酸性（pH<6.5）であることが報告されている[4~6]。そこで，FGF-2を安定に担持し，虚血性疾患に伴うpHの低下を認識して収縮することでFGF-2を選択的に徐放し，回復に伴うpHの上昇を認識して膨潤することでFGF-2の徐放を停止する，機能性バイオマテリ

[*1]Michiya Matsusaki　大阪大学　大学院工学研究科　応用化学専攻　助教
[*2]Mitsuru Akashi　大阪大学　大学院工学研究科　応用化学専攻　教授

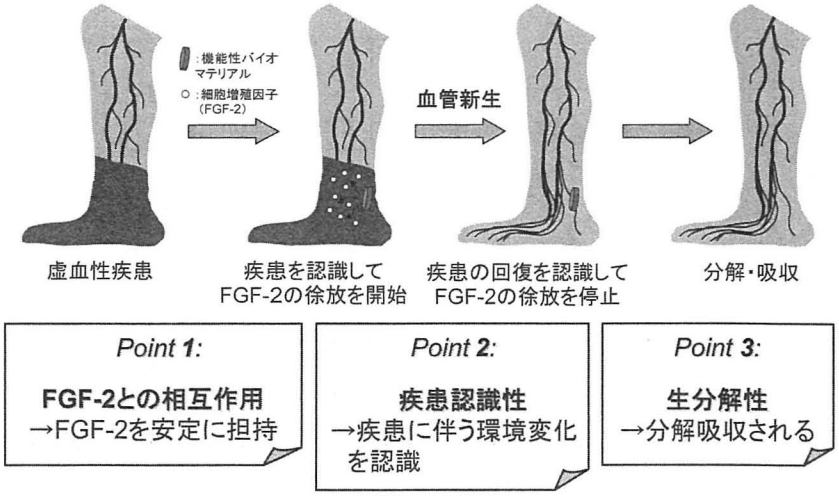

図1　虚血性疾患を認識してFGF-2の徐放を制御する機能性マテリアルのイメージ

アルの開発を試みた。本マテリアルの開発には，①FGF-2との相互作用，②疾患部位認識性，③生分解性，の3つがポイントであると考えて，研究に取り組んだ（**図1**）。その結果，*in vitro*での徐放実験において，虚血性疾患モデル環境（酸性）を認識してFGF-2を徐放し，回復モデル環境（中性）を認識してFGF-2の徐放を自ら停止する，大変興味深い結果が得られた。本研究で開発されたマテリアルは，新しい再生医療用の機能性バイオマテリアルとしてその応用が期待される。

2. FGF-2と相互作用するポリγ-グルタミン酸誘導体の分子設計と合成（Point 1）

生体内において，FGF-2はヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）と静電的相互作用を駆動力としたコンプレックスを形成することで安定化している[7]。このコンプレックス形成にはHSPGの硫酸基（強酸）とカルボキシル基（弱酸）の割合が重要であり，またHSPGのヘリックス構造が相互作用を誘起していることが報告されている[7, 8]。そこで，生分解性と反応性官能基を有するポリアミノ酸の電荷とナノ構造を制御することで，FGF-2と相互作用する新規な生分解性ポリアミノ酸が開発できるのではないかと考えた。ポリアミノ酸としてカルボキシル基を有するポリγ-グルタミン酸（γ-PGA）を選択した。γ-PGAは納豆菌が産生するポリペプチドで，生分解性や生体適合性に優れている[9]。

筆者らはこれまで，γ-PGAを用いた生分解性ナノ粒子や感熱応答性ハイドロゲルの調製などを報告してきた[10~12]。γ-PGAのカルボキシル基に2-アミノエタンスルホン酸（タウリン）を縮合することで，γ-PGAにスルホン基（強酸）を導入した[13]。タウリンの導入は，赤外吸収スペクトル（IR）と核磁気共鳴スペクトル（^{1}H-NMR）より確認した。タウリンと縮合剤である水溶性カルボジイミド（WSC）の仕込み量を変えることで，タウリンの導入率を10～80％まで制御することが可能であり，スルホン化γ-PGA（γ-PGA-S）のカルボキシル基とスルホン基の割合を制御することができた。

合成したγ-PGA-Sのスルホン基（強酸）とカルボキシル基（弱酸）の割合が電荷に与える影響を調べるため，リン酸緩衝生理食塩水（PBS，pH＝7.4）中のゼータ電位を測定した（**図2 a**）。スルホン基の割合に従いゼータ電位は減少し，スルホン基が81％のγ-PGA-S（γ-PGA-S81）は，FGF-2とコンプレックスを形成することが知られているヘパリン（－37.7mV）とほぼ同じマイナス電位を示した（－36.2mV）。そこで，72％の

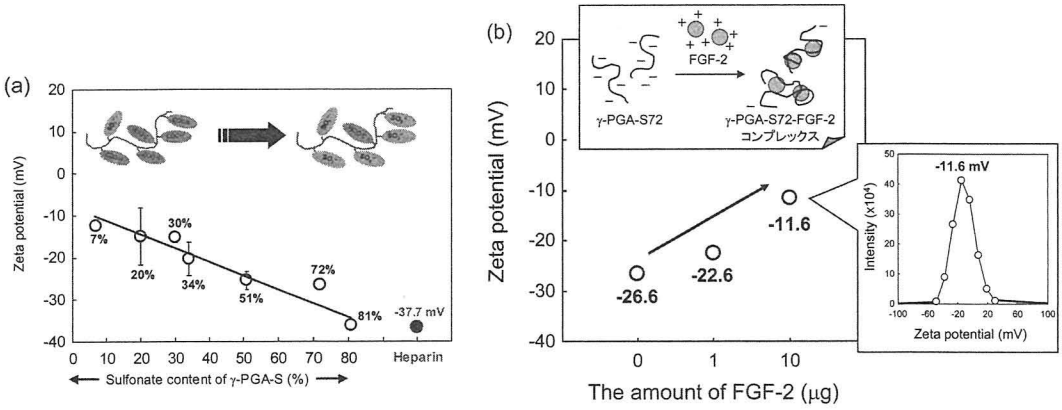

図2　γ-PGA-S のスルホン化度とゼータ電位の関係(a)とγ-PGA-S72 に FGF-2 を添加した時のゼータ電位の変化(b)

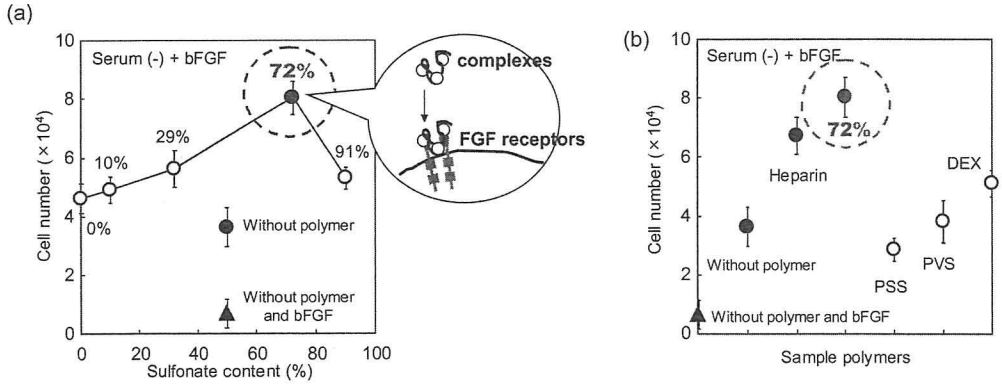

図3　マウス L929 繊維芽細胞の増殖試験による γ-PGA-S と FGF-2 のコンプレックス形成評価(a)と他のヘパリノイドとの比較(b)

スルホン基を有する γ-PGA-S（γ-PGA-S72）の 1 mg/mL の PBS 溶液に FGF-2 を添加した結果，FGF-2 の濃度の増加に従いゼータ電位は増加し，ピークは単峰性であった（図 2 b）。

FGF-2 は中性環境でカチオン性を示すため（等電点は 9.6），γ-PGA-S72 と FGF-2 がイオンコンプレックスを形成することが示唆された。γ-PGA-S と FGF-2 のコンプレックス形成を詳細に検討するため，HSPG の生合成を抑制したマウス L929 繊維芽細胞を用いて細胞増殖試験を行った（**図 3** a）。HSPG の生合成を抑制された細胞は FGF-2 が HSPG とコンプレックスを形成できず，レセプターとの結合力が低下し，増殖できない[14]。そこで，培地に添加した γ-PGA-S が FGF-2 と安定にコンプレックスを形成できれば，レセプターと結合することで増殖シグナルが伝達され，細胞が増殖すると予想される。

様々なスルホン化度の γ-PGA-S について検討した結果，スルホン化度 72％の γ-PGA-S72 が最も高い細胞数を示した。他のヘパリン様硫酸化ポリマー（ヘパリノイド）と比較した結果，驚くべきことに，γ-PGA-S72 が最も高い細胞数を示し，ヘパリンと同程度であることが明らかとなった（図 3b）。また，γ-PGA-S72 は，酸や熱に対する FGF-2 の保護活性を有していることも見出した[15]。

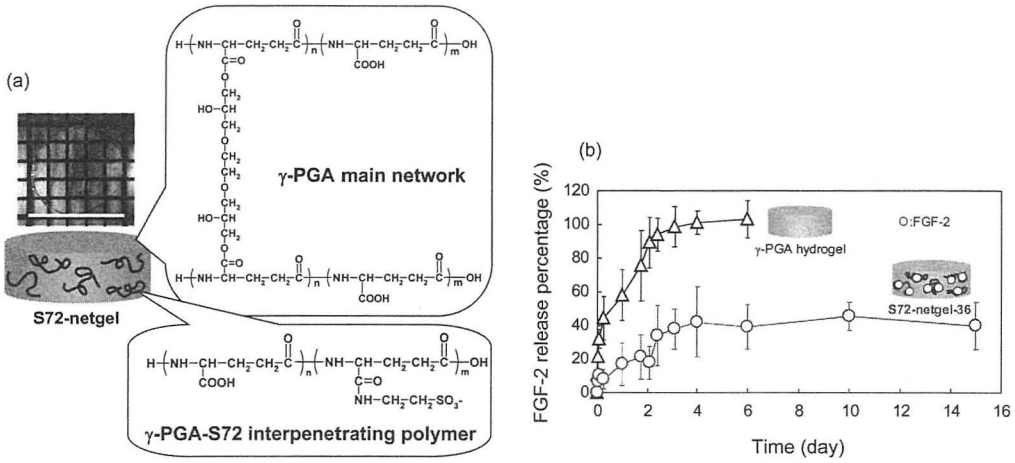

図4　S72-netgel のイメージ(a)と FGF-2 の徐放試験(b)

γ-PGA-S72 と FGF-2 のコンプレックス形成を解明するため，7分子のγ-PGA-S72 と FGF-2 の結合部位との相互作用を MM2 および MOPAC 法による分子モデリングで詳細に検討した。最安定構造を計算した結果，生体内の HSPG と同様に FGF-2 のアスパラギン 102 やリシン 27，アルギニン 121 とγ-PGA-S72 のカルボキシル基やスルホン基が静電的相互作用や水素結合を形成することが明らかとなった[15]。細胞増殖試験とモデリングの結果より，γ-PGA-S と FGF-2 の相互作用にはカルボキシル基とスルホン基のバランスが重要であることが示唆された。また，FGF-2 との安定な相互作用にはヘパリンのような糖骨格が必要であるという従来の報告を覆すものであり，大変興味深い。

3. 酸性環境に応答するスルホン化ポリγ-グルタミン酸ハイドロゲルの調製 (Point 2)

これまでの報告で，ポリメタクリル酸などカルボキシル基を有するハイドロゲルは，酸性環境下でカルボキシアニオンのプロトン化に伴う収縮能を示すことが知られている[16, 17]。FGF-2 と安定に相互作用することが確認されたγ-PGA-S72 もカルボキシル基を有しているため，γ-PGA-S72 のハイドロゲルが調製できれば，FGF-2 を安定に担持し，かつ虚血性疾患環境（酸性環境）に応答する機能性マテリアルが得られると考えた。しかしながら，γ-PGA-S72 のハイドロゲルを調製するためにはカルボキシル基を用いて架橋する必要があり，その結果，スルホン基とカルボキシル基のバランスが崩れ，FGF-2 との相互作用が弱まる恐れがある。そこで，γ-PGA で架橋ネットワークを形成し，γ-PGA-S72 を内包した semi-IPN 様ヘテロゲル（S72-netgel）を調製した（図4 a)[18]。調製された S72-netgel は凍結乾燥により約 100～500 μm の孔を有したスポンジ状になり，また細胞接着性に優れていることが確認された。

実際の治療で副作用を軽減するためには，回復時（中性環境）においてマテリアルが FGF-2 を安定に保持することが重要である。そこで，S72-netgel が中性条件で FGF-2 を保持できるか検討するため，トリス緩衝液（pH＝7.4）中での S72-netgel からの FGF-2 の徐放量を評価した（図4 b)。比較としてγ-PGA-S72 を含まないγ-PGA ハイドロゲルを用いた。γ-PGA ハイドロゲル（直径 1 cm，厚さ 1 mm）の場合，FGF-2 の吸着量はおよそ 120ng であり，6日間のインキュベート後にはほぼ全ての FGF-2 が徐放されることが分かった。一方，γ-PGA と等量のγ-PGA-S72 を含む S72-netgel（S72-netgel-36，ゲル全体の

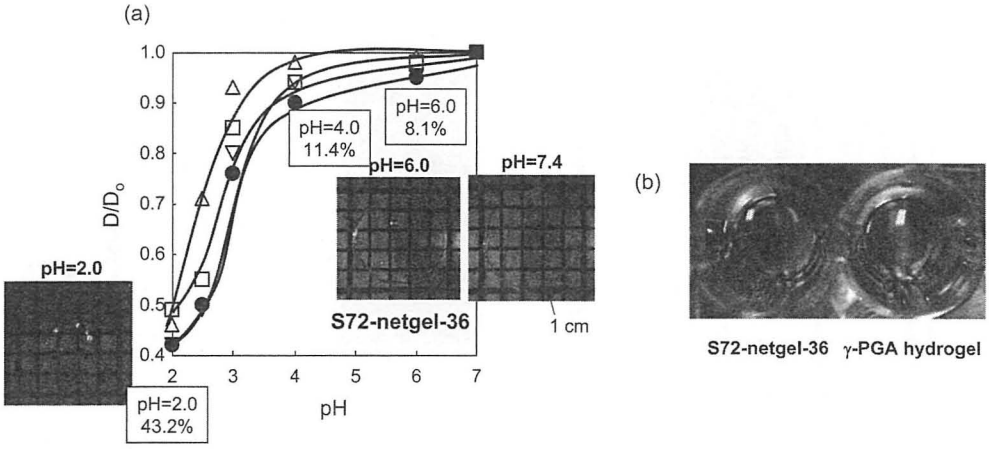

図5 γ-PGAゲル（△），S72-netgel-6.5（□），S72-netgel-17（▽），S72-netgel-36（●）の各pHにおける24時間後の直径の変化率(a)と，g-PGAゲルおよびS72-netgel-36の培地中での色の変化(b)

カルボキシル基に対して36％のスルホン基を有する）は，およそ280ngのFGF-2を吸着し，15日間のインキュベート後も約60％のFGF-2を保持していることが確認された[19]。これは，γ-PGAの架橋ネットワーク中においてγ-PGA-S72は架橋されずにその運動性を保持しており，FGF-2と安定に相互作用できるためと考えられる。以上より，S72-netgel-36は回復環境である中性条件下でFGF-2を保持し，非特異的な徐放による副作用の発現を軽減することが期待される。

また，虚血性疾患環境（酸性環境）でのハイドロゲルの応答性について検討した。γ-PGAハイドロゲルおよびS72-netgel共にpH＝4.0以下で収縮することが明らかとなった。これは，カルボキシアニオンのプロトン化に伴う分子鎖間の相互作用に起因すると考えられる。また，各pHにおける収縮率はγ-PGA-S72の割合に依存して増加する傾向を示し，γ-PGA-S72の割合が最も高いS72-netgel-36はγ-PGAのpKa(2.27)以上のpH＝6.0（虚血性疾患部位と同じ酸性度）においても約10％程度収縮することが確認された（図5 a)[19]。これは，γ-PGA-S72のスルホン基近傍でのプロトン濃縮効果により，架橋ネットワークを形成しているγ-PGAのカルボキシルアニオンがプロトン化されたことが原因と考察される。このS72-netgel-36のプロトン濃縮効果は，培地に浸漬するとゲルとその近傍のみが黄色に変化することからも確認されている（図5 b)。これは，培地中に含まれるフェノールレッドがゲルのプロトン濃縮を認識して黄色（酸性）を呈したためである。また，酸性環境に応答して収縮したゲルを中性のトリス緩衝液に浸漬すると，再び膨潤することが確認された。しかしながら，平衡膨潤後の直径は元の直径の約7割程度であった。これは，酸性環境で形成された静電的相互作用や水素結合による分子間相互作用が，中性環境で完全に解離しないためであると考えられる。

以上の結果より，S72-netgelは，回復環境（中性条件）でFGF-2を安定に保持し，虚血性疾患環境（酸性条件）を認識して収縮する機能性ハイドロゲルであることが明らかとなった。

4. 虚血性疾患モデル環境に応答したFGF-2の徐放制御

S72-netgel-36が酸性環境を認識して収縮することが確認されたため，この収縮挙動に応答して内包FGF-2が徐放されることが期待される。そこで，物理収縮によるFGF-2の徐放制御を検討した。図6は，pH＝7.4での24時間のインキュベートとpH＝4.0(a)およびpH＝6.0(b)での1時

が観察され，FGF-2が変性せず，その機能を保持していることが示唆された。

以上より，酸性環境を認識して収縮するS72-netgel-36は，その収縮により内包FGF-2を選択的に徐放することが可能であり，徐放されたFGF-2は血管新生を誘導する機能を保持していることが確認された。

5. スルホン化ポリγ-グルタミン酸およびハイドロゲルの生分解性（Point 3）

本研究の戦略では，虚血性疾患の回復後にはマテリアルがFGF-2の徐放を停止し，分解吸収されることが副作用の軽減につながると考えている。そこで，γ-PGA-Sの分解性について検討した。γ-PGAおよびγ-PGA-S10を0.2Mのリン酸緩衝液（pH＝7.4）に溶解させ，80℃で加熱することで加水分解の加速試験を行い，所定時間後の分子量をゲル濾過クロマトグラフィー（GPC）を用いて評価した[13]。γ-PGAの分子量は35万であったが，時間の経過に伴い分子量およそ2,000のオリゴマーが検出され，48時間後には80％以上がオリゴマーレベルまで分解されることが明らかとなった。γ-PGA-S10（分子量15万）はγ-PGAと比較して分解速度が速く，24時間後には80％がオリゴマーレベルに分解された。これは，スルホン基の導入に伴う親水性の向上によると考えられる。

また，調製したハイドロゲルの分解性についても検討した。S72-netgel-36を10％のウシ胎仔血清を含む培地中で所定時間インキュベートすることで培地中での分解性を検討した。また，マウスL929繊維芽細胞をS72-netgel-36にインジェクトし，細胞存在下での分解性についても評価した。細胞非存在下では20日間の培養後においても分解は観察されず安定に存在していたが，細胞を三次元培養すると分解が顕著に観察され，およそ15日後にはゲルが完全に分解されることが明らかとなった。詳細は不明であるが，細胞が産出する酵素などの作用によりゲルが分解されたと考えられる。

以上より，S72-netgel-36を構成するγ-PGAおよびγ-PGA-Sは加速試験により加水分解されることが確認された。また，S72-netgel-36は細胞存在下で特異的に分解されることが明らかとなった。S72-netgel-36は，生分解性の機能性バイオマテリアルとして有効であることが示唆された。

6. おわりに

以上のように，①FGF-2との相互作用，②疾患部位認識性，③生分解性の3つのポイントを考慮してマテリアルの分子設計と合成を行うことで，FGF-2と相互作用し，虚血性疾患（酸性環境）を認識してFGF-2の徐放を自ら制御する新規な機能性バイオマテリアルを開発することができた。本研究のコンセプトは他の疾患・薬物にも応用できることから，普遍性の高いインテリジェントなバイオマテリアルが開発できたと考えている。

筆者らは最近，ジスルフィド結合で架橋されたγ-PGAゲルをテンプレートとすることで，細胞と細胞が産出した細胞外マトリックス成分のみで構成された三次元組織体の構築にも成功している[20]。この三次元組織体とFGF-2の徐放制御マテリアルを組み合わせることで，実用化に近いレベルの新しい再生医療技術が開発できると考え，研究に取り組んでいる。

文　献

1) R. J. Laham *et al.*, *Circulation*, **100**, 1865 (1999)
2) Y. Tabata *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **31**, 287 (1998)
3) H. Nakajima *et al.*, *J. Artif. Organs*, **7**, 58 (2004)
4) K. Na *et al.*, *J. Control. Release*, **97**, 513 (2004)
5) I. F. Tannock *et al.*, *Cancer Res.*, **49**, 4373 (1989)
6) M. Stubbs *et al.*, *Mol. Med. Today*, **6**, 15 (2000)
7) S. Faham *et al.*, *Science*, **271**, 1116 (1996)
8) M. Kunou *et al.*, *Biomacromolecules*, **1**, 451

(2000)
9) H. Kubota *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1212 (1993)
10) M. Matsusaki *et al.*, *Chem. Lett.*, **33**, 398 (2004)
11) T. Shimokuri *et al.*, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, **42**, 4492 (2004)
12) T. Akagi *et al.*, *J. Control. Release*, **108**, 226 (2005)
13) M. Matsusaki *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 23 (2002)
14) K. M. Keller *et al.*, *Biochemistry*, **28**, 8100 (1989)
15) M. Matsusaki *et al.*, *Biomacromolecules*, **6**, 400 (2005)
16) J. Zhang *et al.*, *Macromolecules*, **33**, 102 (2000)
17) Y. Zhang *et al.*, *Polymer*, **46**, 7695 (2005)
18) M. Matsusaki *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **73A**, 485 (2005)
19) M. Matsusaki *et al.*, *Biomacromolecules*, **6**, 3351 (2005)
20) M. Matsusaki *et al.*, *Biomaterials*, **28**, 2729 (2007)