

進化分子工学による結合性成長因子の創成と医学応用
Creation of Binding Growth Factors by Molecular
Evolutionary Engineering and their Medical Applications



伊藤 嘉浩 (ITO YOSHIHIRO)

(独) 理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・主任研究員

研究の概要

本研究は、研究代表者が20余年に亘り提唱してきた成長因子固定化材料の概念を、成長因子の側面からとらえなおし、新しい結合性成長因子を創成し、有機材料や生体組織への固定化だけでなく、金属や無機材料への固定化も可能にし、より広い意味での細胞機能制御生体材料の可能性を追求し、細胞組織工学や再生医療へ応用し、医療へ役立てようとするものである。結合性成長因子の創成法として従来の方法ばかりでなく、進化分子工学、バイオ直交化学なども組み入れ、広く新たな機能性分子創出方法としての可能性も探究する。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学、生体材料学

キーワード：再生医療、組織工学、成長因子、固定化、進化分子工学

1. 研究開始当初の背景

再生医療の実現のためには生理活性をもつ基材をつくる必要がある。これまでに、基材に生体分子である成長因子を固定化することで、細胞の成長や分化のような高次の細胞機能を制御できる新しい人工臓器材料を生み出すことができることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、様々な方法で結合性成長因子を創成することを目指し、なかでも進化分子工学の手法を用いて新しい結合性成長因子を調製し、有機高分子材料や生体組織だけでなく金属・無機材料に結合する成長因子を作成し、医用材料あるいは医薬としての応用展開を図る。

さらに、通常では翻訳後修飾によるのみ導入される非コード・アミノ酸を組み入れた拡張進化分子工学を確立し、高い特異性で強い結合性を付与できるような成長因子設計やアダプター機能を付与による全く新しい機能性分子の創成を試みる。

3. 研究の方法

結合性成長因子の有効性を細胞培養、動物実験で示し、続いてペプチド進化分子工学の方法論を確立し、その方法論を用いた新しい結合性の成長因子を創成し、その生物活性を

検討し、動物実験などにより医療応用の可能性を探る。

従来のコード・アミノ酸だけによるタンパク質工学手法だけでは、導入困難であった翻訳後修飾アミノ酸の部位特異的導入を酵素法によるバイオ直交デザインで可能にする。

さらに、バイオ直交デザインとしてミスアシル化 tRNA 法を組み入れた拡張進化分子工学を可能にし、結合性成長因子を含む新たな機能性分子（アダプター誘導体）を創成できる方法論として確立する。

新たに創成した成長因子群を *in vivo* および *in vivo* で評価し、スキャホールドの有無も含め、医療応用を検討する。

4. これまでの成果

1) 結合性成長因子の創成と機能評価

固定化したフィーダー細胞により、iPS 細胞の未分化状態維持培養が可能であることを示し（発表論文 1）、化学的固定化（発表論文 2）フィブロネクチンのコラーゲン結合性あるいはフィブリン結合性ドメインを従来のタンパク質工学を用いて成長因子（上皮細胞成長因子 EGF、肝細胞成長因子 HGF、線維芽細胞成長因子 FGF、骨形成タンパク質 BMP、血小板由来成長因子 PDGF、血管内皮成長因子 VEGF）に導入した。創成した結合性タンパク質は、各々コラーゲンあるいはフィブリンへの結合をもち、培養細胞を用いて *in*

in vitro で生物活性を発揮することが明らかになった。

コラーゲン結合性骨形成タンパク質は、3次元のコラーゲン-生分解性高分子複合スキャフォールドに結合させることができ、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の骨誘導能に顕著な効果が観察され、生体内埋め込み実験を行ったところ、やはり顕著な骨誘導（骨由来遺伝子の発現、カルシウム沈着などのバイオミネラル化）が観察され、結合性 BMP の有効性が明らかとなった（発表論文 3）。

さらに、このようなスキャフォールドなしに直接動物（マウス）の損傷部位に注射した場合もその部位に2週間以上とどまることが明らかになった（通常の BMP は3日後には消失）。そして顕著に骨関連遺伝子の発現を向上させ、成長因子の分泌も促進した。さらに、頭がい骨を欠損させた上に投与した場合に、結合性 BMP は、スキャフォールドなしでも高い骨誘導能をしめした。損傷部位表面に露出したコラーゲンに結合して活性を発現できたものと考察された。これは、結合性ドメインがターゲティング素子としても活用できることを初めて示した（発表論文 4）。

2) 進化分子工学の手法による結合性成長因子の創成

予定した EGF のカルボキシル末端に 11 アミノ酸からなるランダム配列を挿入し、チタン表面へ結合する結合性 EGF の探索に成功した。従来のファージ・ディスプレイでチタン結合性ペプチドを探索して、その配列を付加した EGF に比べて、より高い結合性をもち、生物活性においても無修飾の EGF と比較して遜色ないことが明らかとなった。これは、従来法では、結合性ペプチドを EGF へ導入することにより、結合性ペプチドにコンホメーション変化を誘起してしまい結合性低下を招いてしまうのに対し、本研究で開発した方法は、最初から EGF に組み入れた配列から結合性を探索するために、高い結合性が得られたものと推測され、今後の進化分子工学による結合性タンパク質（成長因子）設計のための重要な指針が得られた。

3) バイオ直交型タンパク質工学による結合性成長因子の創成

唾液の中にあるアパタイト結合性タンパク質スタセリン、貝類が岩場に接着するためのタンパク質 Mpf が水中接着タンパク質の活性部位は、翻訳後修飾で付加されたり、変換されるリン酸基やカテコール基が活性部位となっている。これらは、従来のタンパク質工学では導入不可能であることから、バイオ直交型（酵素法）による結合性成長因子の合成を開発した。具体的には、スタセリンの活性部位ペプチドと BMP との融合をタンパク質リガーゼであるソルターゼ A を用いて成功させた。調製した結合性 BMP はヒドロキシアパタイトに結合して培養細胞の骨分化を促進

することがわかった。（発表論文 5）

5. 今後の計画

進化分子工学とバイオ直交化学、およびそれらを融合した拡張進化分子工学（発表総説 6）により創成した金属・セラミックス結合性 VEGF および BMP のステント、人工関節などとしての応用性を動物実験により検討する。拡張進化分子工学による、これまでにない診断薬、治療薬、バイオテクノロジー試薬、ドラッグ・デリバリー・システムにおけるターゲティング素子、精密バイオ触媒などへの応用可能性を探索する。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

1. X.-S. Yue, M. Fujishiro, C. Nishioka, T. Arai, E. Takahashi, J.-S. Gong, T. Akaike, Y. Ito, "Feeder cells support the culture of induced pluripotent stem cells even after chemical fixation", PLoS ONE, 7(3), e32707 (2012)
2. B. Joddar, T. Kitajima, Y. Ito, "The effects of covalently immobilized hyaluronic acid substrates on the adhesion, expansion, and differentiation of embryonic stem cells for in vitro tissue engineering", Biomaterials, 32, 8404-8415(2011)
3. H. Lu, N. Kawazoe, T. Kitajima, Y. Myoken, M. Tomita, A. Umezawa, G. Chen, Y. Ito, "Spatial immobilization of bone morphogenetic protein-4 in a collagen-PLGA hybrid scaffold for enhanced osteoinductivity", Biomaterials, 33, 6140-6146 (2012)
4. Y. Shiozaki, T. Kitajima, T. Mazaki, A. Yoshida, M. Tanaka, A. Umezawa, M. Nakamura, Y. Yoshida, Y. Ito, T. Ozaki, A. Matsukawa, "Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused BMP4", Int. J. Nanomed., accepted (2013)
5. M. Sakuragi, T. Kitajima, T. Nagamune, Y. Ito, "Recombinant hBMP4 incorporated with non-canonical amino acid for binding to hydroxyapatite", Biotechnol. Lett., 33, 1885-1890 (2011)
6. T. Uzawa, S. Tada, W. Wang, Y. Ito, "Expansion of Aptamer Library from "Natural soup" to "Unnatural soup"", Chem. Commun., 49 (18), 1786 - 1795 (2013) (総説)

2012年6月 国際生体材料学会連合フェロー
2013年3月 独立行政法人理化学研究所重要業績表彰

ホームページ等

<http://www.riken.jp/nano-med.eng.lab/home.html>