

共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：関西大学化学生命工学部

職名：教授

氏名：平野 義明

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：細胞移植治療を目指したペプチドによる細胞凝集塊の誘導
2. 再生医科学研究所共同研究者： 田畑 泰彦 教授
3. 研究期間： 短期研究課題 ・ 長期研究課題
(平成23年4月1日～平成24年3月31日)

4. 研究経過及び研究成果：

細胞培養は、生体内では要因が複雑で解析不可能な現象を解析可能にする手段として発達してきた。最も一般的な細胞培養方法は単層培養であるが、しかし本来、細胞は特有の三次元的組織構造の中にあるため、細胞を生体から取り出して単層培養系に移すと、その機能がどの程度失われたのかを知ることは困難である。細胞培養技術においてこのような単層培養系の問題点を部分的に克服し、同時に動物実験に比較して簡便性、操作性を保つ三次元培養法が着目されている。組織から得た細胞を三次元培養すると、細胞間相互作用を通じてより親和性の高い細胞同士が接着し細胞凝集塊を形成する。三次元集合体作製方法にはハンギングドロップ法、旋回培養法などがあるが、細胞凝集塊の大きさ等をコントロールすることが難しい。研究者らは、Poly(Lys-Pro)_n(n=10~18)含有の培地を細胞上に添加することで細胞凝集塊を形成する化学的手法を発見した。本研究では、細胞移植治療を目指したペプチドによる細胞凝集塊の形成条件について詳細に検討した。

目的のペプチドは鎖長を限定し(Lys-Pro)_n(n=10, 12, 14, 16)、担体に TrtA-PEG-Resin を用い、縮合剤に DMT-MM を用いた Fmoc 固相法で合成した。ペプチド鎖伸長後、N

末端を脱保護し、95%TFA 水溶液で脱樹脂・脱保護反応を行った。また、合成した粗ペプチドは、透析により単離精製を行った後に、MALDI-TOF-MS 及び HPLC を用いてペプチドの同定、合成の確認を行った。その結果 KP20, KP24, KP28, KP32 を固相法により効率よく得る手法と単離精製が確立できた。

次に合成したペプチド(Lys-Pro)_n(n=10, 12, 14, 16)とマウス線維芽細胞株(L929)の細胞との相互作用の観察を行い、細胞播種数、細胞接着時間、ペプチドの残基数依存性について検討した。細胞をウェルプレート上に播種し、ペプチド含有培地を添加(0日目とする)することで7日間細胞の様子を観察した。

マウス線維芽細胞(L929), KP20, KP24, KP28 を用いて細胞凝集塊を誘導したところ、KP20, KP24 のみ細胞凝集塊を確認できた。また、L929 を用いた際、細胞凝集塊を誘導する条件として細胞数 2.5×10^4 cells/well(96well plate)、細胞接着時間 6時間、ペプチド鎖長 KP20(1.0 mg/mL)が最も良い条件であることがわかった。

L929 を用いたペプチドの細胞毒性試験結果より KP28, KP32 は、細胞毒性があることが認められた。しかし、濃度を小さくした 0.5~0.01 mg/mL では細胞凝集塊を形成したことから、ペプチド鎖長によって細胞凝集塊を形成する濃度が異なることがわかった。また、細胞凝集塊誘導にはペプチドのアミノ酸配列依存性があり、これは、塩基性アミノ酸である Lys の正電荷が影響していると考えられる。

ヒト肝癌細胞(HepG2)を用いた実験では、先と同様細胞毒性が認められる配列があった。ペプチドを添加し培養4日目で細胞凝集塊の形成が認められた。しかし、L929とは異なり培養7日目では死細胞が多く見られたことから細胞種によって細胞の初期播種濃度や細胞凝集塊形成までの培養期間が違うことが分かった。

また、HepG2 のペプチド添加までの細胞接着は、6時間よりも24時間の方が細胞凝集塊の形状が球状に近かったことから、細胞接着時間が長いほど細胞凝集塊を形成することがわかった。HepG2 を用いて、アルブミン産出量を定量したところ、ペプチドを添加し細胞凝集塊を作成した方が、通常の培養よりも約3倍から5倍多くなった。このことは、形成した細胞凝集塊が充分機能していることを示唆する結果である。以上より、ペプチドを用いて細胞凝集塊を誘導しても、機能は損なわれないこと考察できる。

L929 や HepG2 以外にも、human Mesenchymal stem cells(MSC)、ヒト肝細胞、軟骨細胞でも、ペプチドを用いて細胞凝集塊を誘導することが可能となった。以上、ペプチドを用いて細胞凝集塊を容易に誘導できることを明らかにした。これらの結果は、細胞移植治療に向けての非常に重要な基礎的知見であると考えられる。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表等

講演・展示

1) 平野義明, 再生医療をサポートするペプチド材料, 第 10 回国際バイオ EXPO
2011/07/01

ポスター展示 2011/06/29-07/01

学会発表

1) 平野義明, 伊藤友樹, 稲井公二, 岡勝仁, 細胞凝集塊を誘導する周期性ペプチドの機能評価, 第 40 回医用高分子シンポジウム, *医用高分子シンポジウム講演要旨集*, pp. 97 (2011/08/26).

2) 平野義明, 伊藤友樹, 稲井公二, 岡勝仁, 細胞凝集塊誘導ペプチドの設計と機能評価, 第 60 回高分子討論会, *高分子学会予稿集*, **60**, 2, pp. 5010-11 (2011/09/28).

3) 平野義明, 伊藤友樹, 田中愛, 田畑泰彦, ペプチドを用いた細胞凝集塊の誘導, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, *第 33 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集*, pp. 394 (2011/11/22).

学会発表予定

1) Yoshiaki Hirano, Tomoki Ito, Mitsuaki Toda and Yasuhiko Tabata “Functional evaluation of periodic peptide that induces formation of spheroid” 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China, 1-5 June.

2) 平野義明, 田中愛, 岡野将之, 田畑泰彦, ペプチドを用いた細胞凝集塊の誘導と機能評価, 第 41 回医用高分子シンポジウム, (2012/06/26).

3) 岡野将之, 田畑泰彦, 平野義明, 細胞集合体誘導ペプチドの合成と評価, 第 58 回高分子研究発表会[神戸] (2012/07/13).

4) 平野義明, 田中愛, 田畑泰彦, ペプチドを用いた細胞集合体の誘導と機能解析, 第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012/07/17-19).

5) Yoshiaki Hirano, Megumi Tanaka, Yasuhiko Tabata, Functional Evaluation of Peptide that Induces Formation of Cell Spheroid, 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (2012/07/18-20).

投稿予定

1) Yoshiaki Hirano, Tomoki Ito, and Yasuhiko Tabata, Detection of Spheroid Induce Periodic Peptide, to be submitted.