

1F10-2 ガンマ線架橋によるエラスチンモデルペプチドのナノ粒子化

○藤本 真理¹, 古田 雅一¹, 原 正之¹, 村田 充弘², 岩間 眞道³,
ダン ダブリュウ ユウリ⁴
(¹大阪府立大学大学院理学系研究科, ²JSR株式会社筑波研究所, ³有限会社バイオエラスチックジャパン, ⁴Department of Chemical Engineering and Materials Science, University of Minnesota)

【目的】本研究においては、米国のBRL社により開発されたエラスチンモデルペプチドの一定以上の温度で凝集微粒子化するという特性に注目し、凝集させた状態を保ちながら架橋試薬の残留の恐れのないガンマ線照射を行い、薬剤担持可能な架橋ナノ粒子の調製を試みた。

【方法】大腸菌を用いた遺伝子工業技術により作製されたpoly(GVGVP)251の水溶液を調製し、凝集速度、温度を変化させてポリペプチドを微粒子化した。これを保温しながら60Coガンマ線で照射し、架橋粒子の生成を確認した後、動的光散乱法により粒径分布を測定した。また、得られた架橋粒子を用い、薬剤担持徐放の可能性についても検討を行った。

【結果】ポリペプチド水溶液を4℃から42℃へ急速に昇温させ、ガンマ線照射を行うことにより転移温度以下の温度に戻しても、200 nm以下のポリペプチド架橋ナノ粒子が得られた。得られた架橋微粒子に抗がん剤（メトトレキサート）を担持させ、PBS中に徐放させると、約8割の薬剤が短時間で徐放され、残りの2割が徐々に徐放された。

Fabrication of elastin model polypeptide nanoparticles by gamma-irradiation

○Mari FUJIMOTO¹, Masakazu FURUTA², Masayuki HARA²,
Mituhiko MURATA³, Masamichi IWAMA⁴, Urry Dan W.⁵
(¹Graduate School of Science, Osaka prefecture university, ²Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, ³JSR Co.Ltd., ⁴Bioelastic Japan, ⁵Department of Chemical Engineering and Materials Science, University of Minnesota)

Key words elastin, polypeptide, gamma-irradiation, nanoparticles

1F10-4 セルロース結合 FGF2 融合タンパク質の作成と細胞培養への応用

○澤 和紀, 立花 亮, 田辺 利住
(阪市大院・工・化生系)

【目的】再生医療において、特定の領域、つまりパターンングされた領域で細胞の成長が制御できるようになれば、生体内の複雑な形態形成を模倣できるのではないだろうか。本研究ではその足がかりとして、まず特定のマテリアル上で細胞増殖をコントロールしようと試みた。

【方法と結果】セルロースに特異的に結合するタンパク質cellulose binding domain(CBD)と細胞増殖因子fibroblast growth factor-2 (FGF2)との融合タンパク質を作製し、大腸菌で発現した。アフィニティカラムクロマトグラフィーで精製した。これをセルロースバイオマテリアルに吸着させ、マテリアル上での細胞への影響を検討した。マウス前駆骨芽細胞MC3T3-E1は低血清培地中では細胞が伸展せず、また生存できない。ここに FGF2 が存在すると生存可能になる。作製した融合タンパク質CBD-FGF2はセルロースバイオマテリアルに結合し、かつMC3T3-E1を生存させる活性があることが確認された。

【考察】FGF2 は細胞増殖や細胞の未分化維持などの活性があることから、セルロースでパターン化したバイオマテリアル上で幹細胞の未分化状態を維持したまま増殖させることができるのではないかと考えられる。

Cellulose binding domain-FGF2 fusion protein for patterned cell culture

○Kazuki SAWA, Akira TACHIBANA, Toshizumi TANABE
(Dept. Appl. Bioappl. Chem., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words cellulose-binding domain, FGF2, biomaterials, osteoblast

1F10-3 キチン結合ドメイン融合 FGF2 のキチンバイオマテリアルへのローカルデリバリー

○塩谷 知永, 澤 和紀, 立花 亮, 田辺 利住
(阪市大院・工・化生系)

【目的】再生医療の分野において特定の領域で特定の成長因子を働かせることは重要なテーマである。しかし、特定の成長因子を特定の領域にパターン化することは難しい。しかし、バイオマテリアルをパターン化することは比較的簡単である。キチンに結合するドメイン (ChiBD) を繊維芽細胞成長因子 (FGF2) に融合させ、パターン化したキチンに融合タンパクをパターン化させようと試みた。FGF2 は繊維芽細胞をはじめとするさまざまな細胞に対して増殖活性や幹細胞を未分化のまま維持することが知られている。

【方法と結果】ChiBD-FGF2をコードするDNAをプラスミドに導入し、発現プラスミドを構築した。シーケンスによって配列を確認した。大腸菌でChiBD-FGF2を発現させ、大腸菌破砕液上清よりアフィニティカラムクロマトグラフィーで精製し、SDS-PAGEとウェスタンブロットで確認した。ChiBD-FGF2を使って作製したさまざまなバイオマテリアルへの結合を抗 FGF2 抗体を用いて検討した。キチンシートに対する吸着を調べたところ、結合することが確かめられた。セルロースろ紙にキチンをパターン化したものにはキチンをパターン化した部分だけに抗体反応が見られた。また、キトサンを全面に塗布したろ紙に無水酢酸でキトサンを部分的にアセチル化した場合、アセチル化した部分にだけChiBD-FGF2が結合することもわかった。

【考察】パターン化された様々なキチンバイオマテリアルに、FGF2をローカルデリバリーすることが可能となった。

Chitin binding domain-FGF2 : local delivery to chitin biomaterials

○Tomohisa SHIOTANI, KAZUKI SAWA, AKIRA TACHIBANA,
TOSHIZUMI TANABE
(Dept. Appl. Bioappl. Chem., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words biomaterial, chitin binding domain, FGF-2, local delivery

1F10-5 モルモットを用いたケラチンスポンジの抗原性評価

○田辺 利住¹, 立花 亮¹, 塚田 稔², 柏原 純一², 結城 隆²
(¹阪市大院・工・化生系, ²ベネシス)

我々は羊毛ケラチンから3次元多孔体を作製し、新規再生医療用細胞足場としての検討を進めている。今回、ケラチン多孔体の抗原性を調べるため、モルモット皮下に多孔体を埋めこみ、多孔体周辺の病理組織像を検討したので報告する。

(実験方法) モルモットの左側背部皮膚を切開し、圧縮成形または凍結乾燥ケラチン多孔体 (1x1 cm角) を、皮下に挿入した。翌日屠殺後被験物質の周辺組織を摘出し1日1回挿入群とした。2回挿入群は、1回目挿入から3ヵ月後、同様に右側背部皮下に被験物質を挿入した。翌日左側、右側両方の被験物質周辺の組織を摘出した。左側検体は3ヵ月1回挿入群、右側検体は3ヵ月挿入後1日挿入群とした。摘出組織はホルマリン固定後、パラフィンブロックにし、薄切、H・E 染色を行い、病理組織像を観察した。対照群として、被験物質非挿入群、市販止血用コラーゲン多孔体挿入群を設けた。(結果と考察) 抗原性は、3ヶ月留置後1日留置群の皮下脂肪層の炎症性細胞浸潤により判断した。各検体とも1日留置群では皮下脂肪層に変化は見られなかったが、2種のケラチン多孔体及びコラーゲン多孔体の3ヶ月留置後1日留置群では、皮下脂肪層に軽度の炎症性細胞浸潤が見られた。これより、2種のケラチン多孔体は市販止血用コラーゲン多孔体と同等の僅かな抗原性を有していると判断された。各多孔体の体内吸収速度は、コラーゲン多孔体>凍結乾燥体>圧縮成形体の順に小さくなった。

Histological and antigenic evaluation of keratin sponge using guinea pig

○Toshizumi TANABE¹, Akira TACHIBANA¹, Minoru TSUKADA²,
Junichi KASHIHARA³, Takashi YUUKI²
(¹Dept. Appl. Chem. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ., ²Benesis)

Key words keratins, cell scaffold, antigenicity, biomaterials