

## 10<sup>th</sup> International Peptide Symposium (第 55 回ペプチド討論会)

河本 高志

Koji KAWAMOTO

物質化学専攻修士課程 2018 年度修了

### 1. はじめに

2018 年 12 月 3 日から 7 日にかけてロームシアター京都及びみやこめっせにて開催された「10<sup>th</sup> International Peptide Symposium (第 55 回ペプチド討論会)」に参加した。

そして、「Challenge to efficient titanium-cell adhesion by peptide nanofiber with HKH and RGD sequences」をテーマにポスター発表を行った。

### 2. 研究背景

チタンおよびチタン合金は生体適合性が高く、耐腐食性、軽量といった性質をもち、インプラント材として広く利用されている。骨表面に存在する骨芽細胞がインプラント材であるチタンと静電吸着することで接着し、骨化が進行すると一体化する。従来、チタン表面にサンドブラスト法やアルカリ加熱処理法により加工を施し、凹凸面を形成することで表面積を増加させ、細胞吸着の促進を行ってきた。しかし、近年の臨床研究によりインプラントの緩みと感染症のリスクが問題視されるようになった。処置後初期段階での細胞接着が不十分で骨形成に長期間要し、その間の不安定な結合状態がインプラント失敗を招く。そして、チタン表面の非特異的な細菌や各種タンパク質の吸着が原因で重篤な感染症発症の例も報告されている。特に、バイオフィルムの形成はインプラント治療の脅威となっており、早急な問題解決が望まれる。現在、ポリマーや生体模倣タンパク質を利用した手法、イオン注入法、レーザー加工など種々取り組まれているが問題の解決には至っていない。そこで、当研究室では細胞とチタンへ

特異的に吸着するアミノ酸配列をもつ多機能性ペプチドを使用し、問題の解決を考えた。細胞と特異的に結合する配列として RGD が広く知られており、これは細胞外マトリックスであるインテグリンと特異的に結合する。チタンへ特異的に結合する配列として (min) TBP-1 など数種あるが、最短配列である HKH 配列を選択した。そして、疎水性、親水性残基を交互に配列し、線維状集合体をとるペプチド配列の C 末端に RGD, N 末端に HKH 配列を修飾した。このペプチドを集合化させ、チタン表面に被膜させることにより、表面積の増大と RGD による効果的な細胞接着を目指した。

### 3. 実験方法

ペプチドを pH 11, 9, 7, 5, 3 に調製したリン酸ナトリウム溶液中で 7 日間集合化させ、CD と AFM により二次構造評価と形態観察を行った。その後、チタン表面にペプチドを被膜し、AFM と XPS によりペプチドの存在を確認した。続いて、ペプチド被膜したチタン表面へマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を播種し、セルカウントキットを用いた吸光度測定と CMFDA 染色による蛍光顕微鏡観察にて行った。

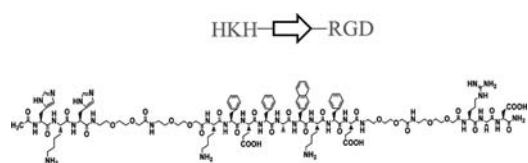


図 1 使用したペプチド配列

### 4. 結果・考察

溶媒が pH 6 以下であると HKH が正に荷電し静電反発を引き起こし、ランダムコイル構造の粒状集合体をとる。pH 7 以上で  $\beta$  シート構造の線維状をとることが AFM, CD より確認できた。

pH 7 に調製した緩衝液中でペプチドを 7 日間集合化させ、チタン表面へ滴下し一定時間静置し、PBS で洗浄した試料を XPS と AFM により結合性

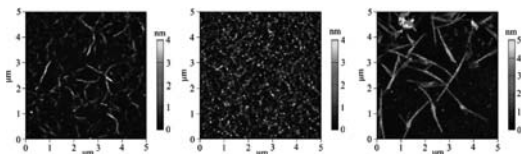


図2 AFM [On Si] (左から pH 11, 9, 7)  
Peptide : 100  $\mu$ M, 7 days incubation

表1 XPS による元素分析

	C1s	N1s	O1s	Si2p	Ti2p3
6 h	58.447	10.842	23.914	0.12	6.677
12 h	54.304	10.314	27.878	0.343	7.165
24 h	57.599	9.507	25.204	0.344	7.347

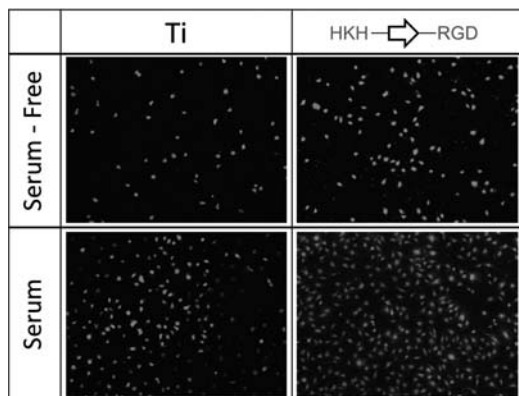


図3 蛍光顕微鏡像

を評価した。N1s はペプチド中のペプチド結合、または塩基性アミノ酸の側鎖に由来し、N1s 比率の増加と Ti2p3 比率の低下によりペプチドの存在が確認できる。測定結果より、ペプチドの存在が確かめられ、AFM よりも線維状ペプチドの像が得られた。

続いて、ペプチド被膜したチタン表面へ MC3T3-E1 細胞を  $3.0 \times 10^4$  cell 播種し、血清入り培地と無血清培地中で3時間インキュベーションした。その後、セルカウントキットを加え、吸光度測定を行い細胞の定量を試みた。結果、無血清培地中でインキュベーションしたものはペプチドの効果が認められ

ず、血清培地中では優位に初期細胞接着が達成された。その後、十分に洗浄した細胞接着済みチタン板を CMFDA により染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。すると、吸光度測定の結果と同様に、無血清培地中では初期細胞接着が限定的で、血清培地中ではペプチド被膜面へより多くの細胞接着が確認された。以上のことよりペプチドの有効性が確認できた。

## 5. まとめ

溶媒の pH 調整により、ペプチド集合体の形態制御を可能とした。線維状に集合させたペプチド溶液をチタン表面へ滴下し、XPS と AFM により接着性を評価すると、チタン表面上のペプチドの存在が確認できた。このチタン表面に MC3T3-E1 細胞を播種し、3時間の初期細胞接着評価をセルカウントキットによる吸光度測定と CMFDA 染色による蛍光顕微鏡観察により行ったところ、血清入り培地で培養した細胞は効果的に細胞接着が達成されたが、無血清培地中ではペプチドの効果が確認できなかった。

今後、チタン表面へのペプチド吸着量定量方法と、吸着量増大を可能にする手法の確立をめざしたい。また、細胞の長期間培養を行い、ペプチドの存在が細胞増殖にどのような影響を与えるのか評価を行いたい。

## 6. おわりに

幸せなことに、多くの方にポスターを見ていただき、質問をいただいた。その中で、新たなアイデアを頂き、反省すべき点も見つかった。今後の研究の糧となるように、深く受け止めた。

最後に、研究指導いただいた富崎欣也教授、山崎正幸准教授、研究室の皆様へ厚くお礼申し上げます。