

物質保持能を制御できるコラーゲン擬似分子の作製

大阪府立大学 21 世紀科学研究機構 ナノ科学・材料研究センター

児島 千恵

Collagen is the most abundant protein in mammals, and it is composed of glycine-proline-(hydroxy)proline (Gly-Pro-Hyp) repeats to form a triple helix. It has been used as a biomaterial. For example, collagen gels are useful for long-term slow release in drug delivery applications. However, the release from collagen gels is generally uncontrollable. Therefore, functional collagen materials capable of controlled release are desired. Artificial collagen materials have been studied as an alternative to natural collagens extracted from animals, because natural collagens can be contaminated with infectious pathogens and allergens. However, short collagen peptides cannot form a triple helix, which limits the preparation. Dendrimers have highly controllable sizes, topologies and surface properties, quite different from linear polymers. We have reported that polyethylene glycol (PEG)-attached dendrimers are a potential drug carrier. In addition, dendrimers were used as a knot, whose terminal groups were modified with collagen model peptides to induce the triple helical structures.

In this study, a collagen model peptide ((Pro-Pro-Gly)₅)-attached dendrimer was synthesized as a potential functional collagen material. The peptides which clustered at the surface of the dendrimer formed a collagen-like triple helix. Interestingly, the helical structures were thermally reversible, different from a natural collagen. For the biomedical applications, the thermal stability of the triple helical structure in the collagen-mimic dendrimer remains to be improved. Various collagen-mimic dendrimers were prepared by using different generation dendrimers and a longer collagen model peptide, (Pro-Pro-Gly)₁₀. The peptide length much affected the triple helical structures, but the dendrimer generation did not. The peptide binding ratio slightly affected it. These results suggest that the peptide length and the peptide density were influenced on the triple helix formation. Interestingly, the (Pro-Pro-Gly)₁₀-modified dendrimer assembled below 40°C and the assembly was dissolved by heating. On the other hand, the (Pro-Pro-Gly)₅-modified dendrimer did not. The hydrogels using these collagen-mimic dendrimers were prepared. Even though the (Pro-Pro-Gly)₅-modified dendrimers formed the hydrogels by cooling only in the presence of ethanol and sodium sulfate, the (Pro-Pro-Gly)₁₀-modified dendrimer could in the absence of any additives. In addition, the hydrogel was dissolved at 45°C. Therefore, this kind of collagen-mimic material is useful for drug delivery system and regenerative medicine.

1. 緒言

コラーゲンは細胞外基質に多く含まれる分子量約 10 万の棒状蛋白質であり、生体材料として有用である。コラーゲンには繰り返し配列があることが知られており、グリシン-プロリン-プロリンの繰り返しペプチドはコラーゲンモデルペプチドとしてよく用いられている。このような繰り返し配列によってコラーゲンは三重ヘリックス構造を形成し、さらに、それらが会合することによってゲル化することが知られている。一方、コラーゲンが熱変性したゼラチンも分子間で見られる三重ヘリックス構造が架橋点となってゲルを生成する。このようなゲルには、水とともに様々な生理活性物質が保持されるため、長期間の徐放化材料として医薬品および化粧品の分野で既に多くの研究されてきた。しかし、保持された生理活性物質の効果を最大限に発現するためには、単なる徐放ではなく何らかの刺激に応答

して内包物質を放出するシステムが有効である。しかし、現在のところ刺激応答性のコラーゲン（ゼラチン）ゲルの開発には至っていない。

一方、著者らはこれまでにデンドリマーを薬物運搬体として利用したドラッグデリバリーシステムの研究を行ってきた。デンドリマーは樹状構造をとる合成高分子であり、重合ではなく有機合成によって分子鎖を分岐させながら成長させていくため、段階的に分子量（世代数）を増加させることができる。デンドリマーは分子量が単一であるだけでなく、表面には多数の反応性官能基を、内部には低分子を保持できる空間を有するため、ペプチドの担体や薬物運搬体として有用である。筆者らはこれまでに、デンドリマーに抗がん剤などを内包して薬物運搬体として利用したり、様々な刺激応答性部位を付与することで刺激応答性デンドリマーの作製を行ってきた¹⁻⁵⁾。本研究では、薬物保持能を有するデンドリマーを用いて、薬物の放出を制御することのできる新規コラーゲン擬似分子の作製を行った。そこで、コラーゲンでみられるグリシン-プロリン-プロリン (Gly-Pro-Pro (GPP)) の繰り返しペプチドと、ペプチド担体および薬物運搬体であるデンドリマーからなる分子を設計した。コラーゲンの三重ヘリックスは温度によってその形成性が変化することが知られているため、このデンドリマーでは温度による内包物質の放出制御が可能であると考え



Preparation of Collagen-Mimic Compounds Capable of Controlled Release

Chie Kojima

Nanoscience and Nanotechnology Research Center, Research Organization for the 21st Century, Osaka Prefecture University

えられる。また、デンドリマーの薬物保持能を利用したハイドロゲルも作製できると考えられる(図1)。本研究では、まず(Pro-Pro-Gly)₅(PPG5)をポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマー(第4世代)と結合させたコラーゲン擬似デンドリマーを合成した。そして、その高次構造と温度依存性について検討した。次に、上記コラーゲン擬似デンドリマーにおけるコラーゲン様の高次構造の改善のため、様々な世代数のPAMAMデンドリマーを用いてコラーゲン擬似デンドリマーの合成を行い、その高次構造の解析を行った。また、長鎖の(Pro-Pro-Gly)₁₀(PPG10)を用いたコラーゲン擬似デンドリマーも合成し、その高次構造を解析した。そして、そのコラーゲン擬似デンドリマーの会合体について検討した。さらに、コラーゲン擬似デンドリマーのハイドロゲルの形成性について検討した。

2. 実験

2.1 コラーゲン擬似デンドリマーの合成

市販のコラーゲンペプチドPPG5およびPPG10を無水酢酸でアセチル化した。次に、PPG5に関しては縮合剤*o*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU)と補助剤、1-Hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt)を用いてポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマー(第1世代から第5世代、G1-G5)と反応させ、世代数の異なるコラーゲンデンドリマーを合成した(PPG5-G1; PPG5-G2; PPG5-G3; PPG5-G4; PPG5-G5)。また、PAMAMデンドリマー(G4)に対して反応の仕込み比を調整することで、様々なペプチド結合数のコラーゲンデンドリマーを合成した((PPG5)_{0.3}-G4; (PPG5)_{0.5}-G4; (PPG5)_{0.8}-G4)。一方、PPG10に関しては縮合剤4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM)を用いてPAMAMデンドリマー(G4)と反応させた(PPG10-G4)。

2.2 コラーゲン擬似デンドリマーの同定

¹H NMRはJEOL JNM-LA400 (JEOL)を用いて行った。

フルオレスカミンによるアミンの定量は以下のように行った。適当な濃度のコラーゲンデンドリマー水溶液(5～

10 mg/ml)を調製し、それぞれ400 μlに0.5M ホウ酸緩衝水溶液(pH 8.5)を3.6mlに加えた。その後それぞれにフルオレスカミンのアセトン溶液(0.3mg/ml)を200 μlずつ加え、ボルテックスした。分光蛍光光度計(FP-6200, JASCO)を用いて、励起波長390nm、蛍光波長479nmで蛍光強度を測定した。アミン濃度が0, 20, 50, 100, 150, 200 μMのデンドリマー水溶液を用いて同様の操作を行い、検量線を作成した。

2.3 コラーゲン擬似デンドリマーの高次構造の解析

各サンプルの水溶液(0.04 mg/ml)を調製し、4℃で24時間以上インキュベーション後、円二色性分散計(J-820, JASCO)を用いて20℃、260–190nmで測定を行った。温度変化測定は、上記と同様にサンプル調製し、4℃で上記と同様の波長で測定した後、10℃から70℃まで5℃毎に昇温、続いて降温し、CDスペクトル測定を行った。なお、各温度では15分間保持した後に測定を行った。温度の調整にはセルチェホルダ(PTC-432L, JASCO)を用いた。

X線粉末回折法(XRD)はMiniFlexII(リガク社製)を用い、30kV, 15mAの出力でCuKα線を使用して行った。

2.4 PPG10-G4の会合体の解析

示差走査熱量測定(DSC)はNano-DSC II (Calorimetry Science社製)を用いて、1 mg/mlのサンプル溶液を5℃から90℃の範囲で測定した。

透過型電子顕微鏡(TEM)解析では、まず10mg/mlのサンプル溶液を室温でグリッドに滴下し、2%リンタンゲステン酸水溶液によってネガティブ染色し、試料を調製した。そして、JEOL2000 (JEOL)を用いて、200 kVの条件で観察した。

温度変化透過率測定は1 mg/mlの水溶液を4℃で12時間以上保持した後、313nmにおける透過率をJASCO V-630を用いて測定した。温度は1℃/minで変化させた。

2.5 ハイドロゲルの作製

15wt%のPPG10-G4およびPPG10の水溶液を調製し、4℃で12時間以上保持した。その後、ステンレスボールを

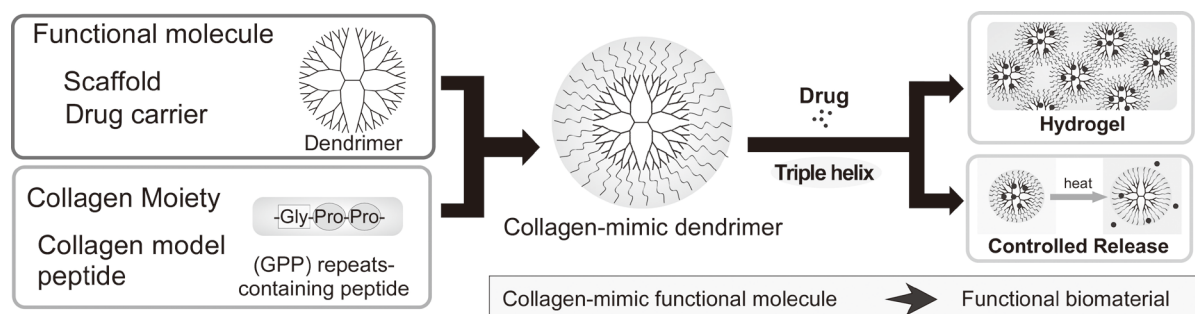


Fig. 1 Design of collagen-mimic dendrimers and application.

上加え、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃で順にそれぞれ15分間インキュベーションした後に写真を撮影した。ボールが溶液の上もしくは中にある状態をゲル、チューブの底に沈んだ状態をゾルとした。

3. 結果

3.1 PPG5を結合したPAMAM (G4)デンドリマー

合成スキームを図2に示す。PPG5をアセチル化した後に、G4のPAMAMデンドリマーのアミン末端と結合させた。得られた化合物の¹H NMRスペクトルおよびフルオレスカミンによる残存アミンの定量を行った。その結果より、デンドリマーのほぼ全ての末端にペプチド鎖が結合していることがわかった。次に、このコラーゲン擬似デンドリマーのCDスペクトル測定を行った。コラーゲンの三重ヘリックスでは225 nm付近に正の極大が見られることが知られている。コラーゲンデンドリマーのCDスペクトルではコラーゲン特有のパターンが見られたことから、コラーゲンデンドリマーではコラーゲン様の三重ヘリックスが形成することを明らかにした。ペプチド単独では特徴的なコラーゲンのCDスペクトルが見られなかったことから、デンドリマー表面におけるペプチド集積が三重ヘリックス形成性を惹起することが示唆された⁶⁾。また、XRDの結果から、コラーゲンデンドリマーにおいてコラーゲン三重ヘリックスのパッキングとピッチに起因するシグナルがみられた。このことから、デンドリマーで見られる高次構造がコラーゲン様の三重ヘリックスであることがわかった。このコラーゲンデンドリマーを用いてハイドロゲル形成を行ったところ、15 wt%、かつ、エタノールと硫酸ナトリウム共存下においてのみ、ハイドロゲルが形成した⁶⁾。

3.2 PPG5を結合したPAMAM デンドリマーにおける高次構造形成性の改善⁷⁾

上記のコラーゲンデンドリマー (PPG5-G4) ではコラーゲン様の三重ヘリックス形成が見られたが、その形成性は天然のコラーゲンと比べると低かった。次に三重ヘリックス形成性の向上のために、デンドリマーの構造に着目して、コラーゲンデンドリマーの改善を行った。すなわち、デンドリマーの

世代数やペプチド結合率の異なる様々なコラーゲンデンドリマーを合成し、その高次構造形成性について評価した。

3.2.1 PPG5を結合したデンドリマーにおけるデンドリマー世代数の効果

G1からG5のPAMAMデンドリマーを原料として用い、図2と同様の方法でコラーゲンデンドリマーを合成した。合成した化合物の¹H NMRスペクトルおよびフルオレスカミンアッセイにより、デンドリマーに結合したコラーゲンモデルペプチド数を定量した結果を表1に示す。デンドリマーの末端数とペプチド結合数がほぼ一致すること、デンドリマーにおける未反応アミン数がほとんど検出されなかったことから、いずれのデンドリマーでもほぼ全ての末端にペプチド鎖が結合していることがわかった。

これらのコラーゲンデンドリマーのCDスペクトル測定を行った結果を図3に示す。いずれのコラーゲンデンドリマーでも225 nm付近にコラーゲン特有の正の極大を示すスペクトルが得られた。しかし、そのパターンはデンドリマーの世代によっては差異が見られなかったことから、デンドリマー世代数はヘリックス形成性に影響を与えないことがわかった。

3.2.2 PPG5を結合したデンドリマーにおけるペプチド結合率の効果

アセチル化したPPG5とG4のPAMAMデンドリマーを原料として用い、様々な比で反応させることにより、ペプチド結合率の異なるコラーゲンデンドリマーを合成した。合成した化合物の¹H NMRスペクトルによりデンドリマーに結合したコラーゲンモデルペプチド数を定量した結果を表1に示す。これより、反応の仕込み比に依存してデンドリマーの末端に様々な含率でペプチド鎖が結合したことがわかった。

これらのコラーゲンデンドリマーのCDスペクトル測定

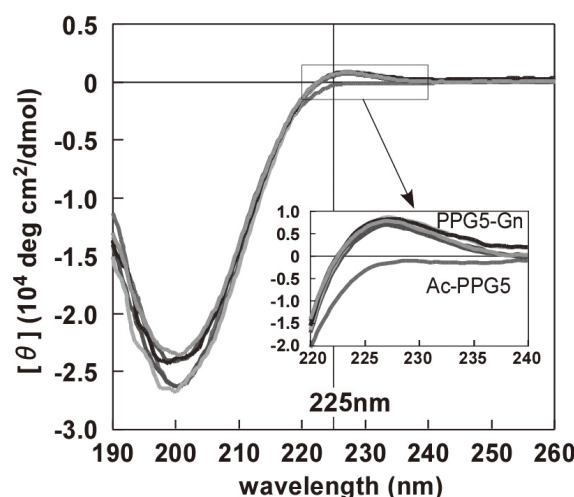


Fig. 3 CD Spectra of PPG5-Gn and Ac-PPG5 in H₂O (20℃, 0.04mg/ml)

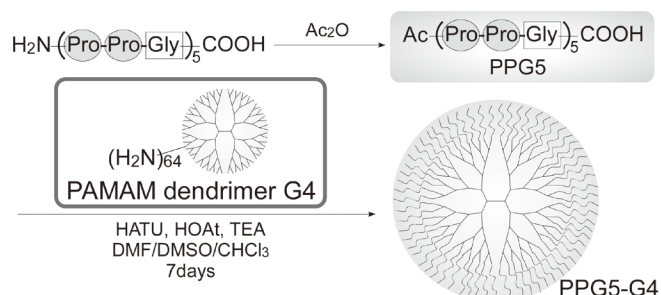


Fig. 2 Synthetic scheme of collagen-mimic dendrimers.

を行った結果を図4に示す。ペプチド結合率の異なるコラーゲンデンドリマーでは、末端の83%にペプチドが結合したデンドリマーが最も高いモル楕円率を示した。これは、コラーゲンペプチドが三重ヘリックス構造を形成するためには、ペプチド鎖の密度が重要であることを示唆している。以上より、コラーゲン様の三重ヘリックス構造の形成はコラーゲンペプチドの集積化によって誘起されていると考えられる。コラーゲンの三重ヘリックス形成性を示す指標としてRpn値がある。これは225 nm付近の正の極大ピークと200 nm付近の負の極大ピークの比である⁸⁾。天然コラーゲンが0.11であったのに対して、PPG5デンドリマーで最も効率の高かった(PPG5)_{0.8}-G4では0.06であった。したがって、その三重ヘリックス形成性は依然として低調なままであり、コラーゲンデンドリマーのさらなる改善が必要である。

3.3 PPG10 を結合した PAMAM (G4) デンドリマー⁹⁾

3.2においてPPG5を結合したコラーゲンデンドリマーでは、結合率を変化させることで僅かに高次構造形成性が向上したものの、著しい高次構造形成性の向上はみられなかった。次に、高次構造形成性の改善を目的としてペプチドの鎖長に着目した。PPG5はPPG2と比べて三重ヘリックス構造の形成性が著しく向上することを既に報告している⁶⁾。そこで、より鎖長の長いPPG10をG4デンドリマーに結合させたデンドリマーを作製し、その高次構造形成性について検討した。

まず、図2に示すように、PPG10をアセチル化した後に、G4のPAMAMデンドリマーのアミン末端と結合させた。ペプチドの溶解性の問題により、デンドリマーとの縮合反応も水中で行い、縮合剤は水溶性のDMT-MMを用いた。得られた化合物の¹H NMRスペクトルおよびフルオレス

カミンアッセイによりデンドリマーのほぼ全ての末端にペプチド鎖が結合していることがわかった。このコラーゲンデンドリマーのCDスペクトル測定においてコラーゲン特有のパターンが見られたことから、コラーゲンデンドリマーではコラーゲン様の三重ヘリックスが形成することが明らかとなった。またこのRpn値は0.13となり、天然コラーゲンに匹敵するものとなった。さらに、XRDの結果からもデンドリマーで見られる高次構造がコラーゲン様の三重ヘリックスであることがわかった。

次に、コラーゲンデンドリマーの三重ヘリックスの温度応答性について検討した。PPG5ではモル楕円率が加温によって徐々に減少するのに対して、PPG10では、ペプチド単独およびコラーゲンデンドリマーのいずれにおいても、ある温度付近で著しいモル楕円率の減少(転移)が見られた。また、ペプチド単独では33℃付近で転移したのに対してコラーゲンデンドリマーでは40℃および65℃で転移がみられたことから、デンドリマーに結合させることで転移点が高温になることがわかった。これは、デンドリマー表層における三重ヘリックス構造の安定化を示唆している。DSCからもこの熱転移を支持する結果が得られた。

コラーゲンはゲル化に際して会合体を形成することが知られている。そこで、本研究ではコラーゲンデンドリマーの会合挙動について検討した。水溶液の濁度について測定したところ、1 mg/mlにおいてコラーゲンデンドリマーは低温で白濁しており、40℃付近で濁度が解消する現象が見られた。この温度はCDにおける一段階目の転移点と一致している。コラーゲンデンドリマーは低温条件では会合体を形成しており、高温にすると会合体が崩壊することが示唆された。

このような温度に応答した会合特性を利用することによってハイドロゲルの作製を行った。PPG5デンドリマー、

Table 1 Characterization of collagen-mimic dendrimers.

Collagen-mimic dendrimer	Number of Terminal amino group	Bound collagen peptide ^{*1}	Residual amino group ^{*2}
PPG5-G1	8	9	0.06
PPG5-G2	16	19	0.16
PPG5-G3	32	32	0.49
PPG5-G4	64	67	0.96
PPG5-G5	128	121	2.4
(PPG5) _{0.2} -G4	64	13	N/A
(PPG5) _{0.5} -G4	64	34	N/A
(PPG5) _{0.8} -G4	64	53	N/A

^{*1} Estimated by ¹H NMR assay ^{*2} Estimated by fluorescamine assay

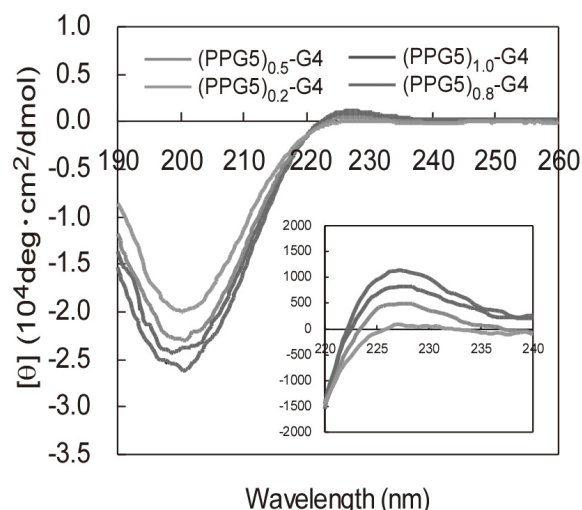


Fig. 4 CD Spectra of (PPG5) n-G4 in H₂O (20°C, 0.04 mg/ml)

PPG10ペプチドでは水溶液中でゲル化しなかったのに対して、PPG10デンドリマーではゲル化することがわかった。得られたPPG10デンドリマーゲルでは低温ではゲルで、45℃以上に加温するとゾル化することがわかった。この温度応答性はコラーゲンの熱変性体であるゼラチンゲルと類似の性質であり、PPG10デンドリマーは人工ゼラチン材料として応用することができる。

4. 考 察

本研究では、物質保持能を有するデンドリマーとコラーゲンモデルペプチドを用いて、様々なコラーゲンデンドリマーの作製を行ってきた。そして、PPG5およびPPG10を結合させたコラーゲンデンドリマーでは、1) コラーゲン様の三重ヘリックス構造をとること、2) その三重ヘリックス形成性は温度に依存することを明らかにしてきた。この温度応答性を利用することで、温度に応答した薬物送達を実現することが可能となる。デンドリマーは様々な薬物を保持することができるため、本研究で作製するコラーゲンデンドリマーは温度応答性薬物送達における薬物運搬体として有用である。我々は、モデル薬物としてローズベンガルを用いて、その薬物放出の温度依存性についても検討した。その結果、ヘリックスが解裂する高温条件下では薬物の保持能が低減することを明らかにしてきた⁶⁾。コラーゲンデンドリマーの応答温度を調節することができれば、生体内で利用できる新規温度応答性薬物運搬体として利用することが可能である。

本研究ではハイドロゲル形成についても検討した。生体に応用するためには、37℃で安定なハイドロゲルを作製する必要がある。PPG10デンドリマーでは上記の条件を満たしていることから、バイオマテリアルとして応用することが可能である。コラーゲンの熱変性体であるゼラチンは30℃付近でゾル化するため、生体内でゲルとして利用するためには架橋が必要である。一方、本研究のコラーゲンデンドリマーでは架橋剤の添加を行うことなく体温付近でのゲル作製が可能であった。また、加温によってゾル化するため、温度応答性薬物送達に応用することもできる。このようなハイドロゲルは温度応答性薬物送達だけでなく、再生医療などへの展開も可能となる。

コラーゲン様の高次構造はペプチド鎖長だけでなく、その配列にも大きく依存することが知られている¹⁰⁾。様々な配列でのコラーゲン擬似分子を作製すれば、様々な用途に適した人工コラーゲン材料の設計・作製することが可能となるため、今後の研究の展開が期待される。

5. 総 括

本研究では、物質保持能を有するデンドリマーとコラーゲンモデルペプチドを用いて、様々なコラーゲンデンドリ

マーの作製を行ってきた。そして、デンドリマーの世代数や結合数よりも、ペプチド鎖長を改善することで、天然のコラーゲンに近い性質を示すコラーゲンデンドリマーの作製に成功した。このようなコラーゲン擬似分子は、次世代のコラーゲン（ゼラチン）材料として、医薬品や化粧品などに応用可能であり、新規素材として大いに有用である。また、この手法を用いることにより、古典的な蛋白質であるにもかかわらず機能が完全には解明されていないコラーゲンの生理活性の解析にもつながると期待される。

本研究成果は3つの学術論文にまとめ、2009年にJ. Am. Chem. Soc. 誌、2010年にBiopolymers誌、2011年にBiopolymers誌に掲載された^{6, 7, 9)}。

本研究は大阪府立大学大学院工学研究科応用化学分野の河野健司教授、原田敦史准教授にご指導いただき、卒業生の津村清子さん（現在、サクラクレパス勤務）、末廣智幸君（現在宇部興産勤務）に協力いただいて、遂行しました。また、DSC測定では京都工芸繊維大学の田中直毅先生に、XRD測定では大阪府立大学の中平敦先生に、XRD解析では東京大学の本郷千鶴博士にご協力いただきました。ここに深謝いたします。最後に、本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいたコスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Kojima C, Kono K, Maruyama K, et al. :Synthesis of polyamidoamine dendrimers having polyethylene glycol grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs, *Bioconjugate Chem.*, 11, 910-917, 2000.
- 2) Haba Y, Kojima C, Harada A, et al. :Preparation of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers encapsulating gold nanoparticles and their heat-generating ability, *Langmuir*, 23, 5243-5246, 2007.
- 3) Haba Y, Kojima C, Harada A, et al. :Comparison of thermosensitive properties between poly(amidoamine) dendrimers having peripheral N-isopropylamide groups and linear polymers with the same groups, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 234-237, 2007.
- 4) Kono K, Kojima C, Hayashi N, et al. :Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin, *Biomaterials*, 29, 1664-1675, 2008.
- 5) Kojima C, :Design of stimuli-responsive dendrimers, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7, 307-319, 2010.
- 6) Kojima C, Tsumura S, Harada A, et al. :A collagen-mimic dendrimer capable of controlled release, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 6052-6053, 2009.
- 7) Suehiro T, Kojima C, Tsumura S, et al. :Higher order

- structure of short collagen model peptides attached to dendrimers and linear polymers, *Biopolymers*, 93, 640-648, 2010.
- 8) Khew SK, Yang QJ, Tong YW, :Enzymatically crosslinked collagen-mimetic dendrimers that promote integrin- targeted cell adhesion, *Biomaterials*, 29, 3034-3045, 2008.
- 9) Suehiro T, Tada T, Waku T, et al, :Temperature-dependent higher order structures of the (Pro-Pro-Gly)10-modified dendrimer", *Biopolymers*, 95, 270-277, 2011.
- 10) Koide T, :Triple Helical Collagen-Like Peptides: Engineering and Applications in Matrix Biology, *Connective Tissue Res.*, 46, 131-141, 2005.