

弾性組織再生のためのエラスチン-フィブリリン複合化材料の開発

Development of Elastin-Fibrillin complex materials for elastic tissues reproduction

○神谷 歩 (三重大), 長谷川 まりな (三重大), 境 淳志 (三重大),

中村 雅広 (三重大), 水谷 直紀 (三重大), 宮本 啓一 (三重大), 堀内 孝 (三重大)

Ayumu Kamiya Mie University, Marina Hasegawa Mie University, Atsushi Sakai Mie University,
Masahiro Nakamura Mie University, Naoki Mizutani Mie University, Keiichi Miyamoto Mie University,
Takashi Horiuchi Mie University

Abstract: Blood vessels and lungs in the body include elastic fibers. Elastic fibers is mainly composed of elastin and fibrillin, it is responsible for the flexibility of the human body. If we can produce materials by mimic elastic fibers using these proteins, it is considered to be able to produce materials that combines the properties required for medical material, such as strength, flexibility and biocompatibility. Therefore, we aimed at development of elastin-fibrillin complex materials. At first, we examined how to extract elastin and fibrillin from porcine aorta. Then, we identified them by SDS-PAGE and amino-acid analysis. Secondly, we examined the most suitable mixture ratio by comparing the interactions of these proteins are mixed. Then, based on this result, we produced elastin-fibrillin complex gel. We could produce complex gel, but this gel didn't have high strength such as elastic fiber. Therefore, we will look for ways to increase the strength.

Key words: elastin, fibrillin, complex materials.

1. 諸言

弾性線維は主にエラスチンやフィブリリンで構成されている。エラスチンはその単量体である分子量が約 67kDa のトロポエラスチンがリシルオキシダーゼにより架橋されることで形成される。フィブリリンにはフィブリリン-1 とフィブリリン-2 が存在しており、体内ではマイクロフィブリルとして存在している糖タンパク質である。このマイクロフィブリル上にトロポエラスチンが沈着し、架橋し合う事で弾性線維は成熟する。そこでこれら二つのタンパク質を組み合わせて、弾性線維を模倣することができれば医療材料に適した材料ができるのではと考えた。そのため、これらのタンパク質を抽出し、材料化するための方法を検討する。

2. 実験手順

(1) エラスチン・フィブリリン抽出

豚大動脈からエラスチン・フィブリリンの抽出を行った。豚大動脈から脂肪や血を取り除き、食塩水で洗浄した。これを加圧加熱した後に乾燥し、粉碎したものを不溶性エラスチンとした。この不溶性エラスチンを 0.25M シュウ酸で1時間加熱した後に分離し、沈殿は再度加熱し、すべて溶けるまで繰り返した。上澄みは水酸化ナトリウムで中和し、遠心分離を行った後に上澄みを水溶性エラスチンとした。この時に析出する沈殿を不溶性フィブリリンとし、この沈殿から水溶性フィブリリンを作製した。

(2) SDS-PAGE

水溶性フィブリリンの同定として SDS-PAGE を行った。5% アクリルアミドゲルで分析を行った。

(3) アミノ酸分析

水溶性エラスチン、水溶性フィブリリンに対してアミノ酸分析を行った。6N HCl で 24 時間加水分解を行い、その後分析を行った。

(4) 複合ゲル作製

水溶性フィブリリンと水溶性エラスチンを任意の比率で混合し、架橋剤を用いてゲルを作製した。それぞれのタンパク質で 30%溶液を作製し、そこに架橋剤 (Dode-DSP もしくは Ethylene Glycol Diglycidyl Ether) を加えた。溶液を脱気後、キャピラリーチューブに詰め加熱した。キャピラリーから取出し、脱イオン水で 18 時間洗浄した後に引っ張り試験器で弾性率を測定した。

3. 結果

(1) タンパク質の抽出

エラスチン・フィブリリンがそれぞれ抽出できた。エラスチンはシュウ酸処理を行った回数で性質が異なるため、それぞれを凝集する際の温度とゲル化した時の弾性率で評価し、エラスチンを A から E までの 5 つに分類した。

Table.1 Classification of elastin.

Elastin	A	B	C	D	E
Elastic modulus (kPa)	50~	25~50	25~5	~5	Not gel
Aggregation degree (°C)	~ 22.5	22.5~25	25~30	30~35	35~

(2) SDS-PAGE

5%のアクリルアミドゲルで 300kDa 付近にバンドを確認した。フィブリリンの分子量は 350kDa であるため、このタンパク質がフィブリリンであると示唆された。

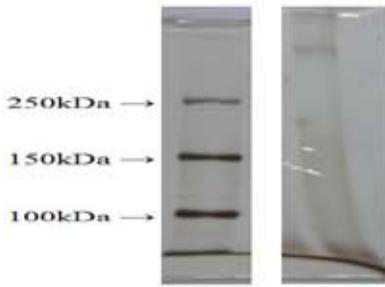


Fig.1 SDS-PAGE. Molecular-weight marker (left). Fibrillin (right).

(3) アミノ酸分析

水溶性エラスチン、水溶性フィブリリンに分析を行った。比較を行ったところ、エラスチンとフィブリリンは全く違う組成をしていることがわかった。また、水溶性フィブリリンがほぼ理論値通りの値を取っていることがわかった。

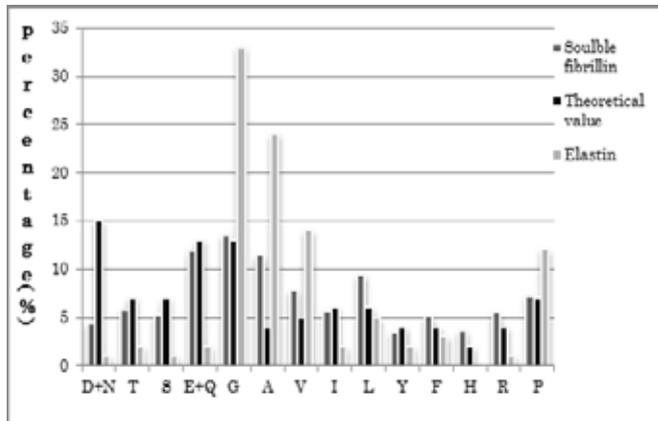


Fig.2 Amino-acid analysis.

(4) 複合ゲル作製

水溶性エラスチン、水溶性フィブリリンを任意の濃度比率で混合した際にゲル化することができた。このゲルの弾性率を測定したが、エラスチン単体のゲルの弾性率大きな違いは得られなかった。しかし、同じ濃度でもエラスチン単体のものよりも混合溶液の方がゲル化しやすい傾向があった。

4. 考察

今回作製できた複合ゲルでは弾性線維と同等の強度ではなく、エラスチンゲル程度の弱い強度であった。実際に体内の弾性線維と同じ構造が出来ているならば強い構造ができるはずである。そのため、ゲルの作製方法、エラスチンとフィブリリンの混合比率、架橋剤、エラスチンとフィブリリンをつないでいる因子などの詳細な検討が必要だと思われる。

5. 結論・展望

エラスチン、フィブリリンの抽出に成功し、それらを用いた複合ゲルを作製することができた。しかし、強度の面で満足いくものを作ることができなかった。そこでゲルの作製方法や混合比率、架橋方法などの検討を行う事でゲルの強度上昇を狙う。

6. 参考文献

(1) 大原健太郎, 弾性板再生型人工血管作製を目的としたエラスチンゲルの力学特性, 平成 21 年度 三重大学修士論文
 (2) Russel Ross, Paul Bornstein, The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components, THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol.40, 1969