

201224121A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

神経再生性人工細胞外マトリクスを用いた  
神経疾患治療法の検討

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 柿木 佐知朗

平成25（2013）年 5月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

神経再生性人工細胞外マトリクスを用いた  
神経疾患治療法の検討

平成 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 柿木 佐知朗

平成 25 (2013) 年 5 月

別添 2

目 次

I. 総括研究報告書（別紙 3）

神経再生性人工細胞外マトリクスを用いた神経疾患治療法の検討.....	1
A. 研究目的.....	1
B. 研究方法.....	3
C. 研究結果.....	6
D. 考察.....	8
E. 結論.....	9
F. 健康危険情報.....	9
G. 研究発表.....	9
H. 知的財産権の出願・登録情報.....	10

II. 研究成果の刊行に関する一覧表（別紙 4） ..... 29

III. 研究成果の刊行物の別刷り ..... 30

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
総括研究報告書

神経再生性人工細胞外マトリクスを用いた神経疾患治療法の検討

研究代表者 柿木 佐知朗

独立行政法人国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

研究要旨

iPS 細胞などより作製される神経幹細胞の内因性・外因性疾患治療への応用に期待が寄せられている。幹細胞移植療法や組織工学的治療の臨床応用を実現するためには、移植した幹細胞の生着や分化の制御や生体内の組織再生を誘導できる細胞外環境の構築が必要となる。そこで本研究では、神経再生性人工細胞外マトリクスよりなる末梢神経再生誘導管および神経幹細胞移植用担体の開発を目指す。

A. 研究目的

高齢化社会の急速な進展に伴い、パーキンソン病などの内因性神経疾患や糖尿病・脳卒中による神経変性疾患などの外因性神経疾患は増加傾向にある。これらに対する治療法として、神経幹細胞移植や末梢神経再生などの組織再生医工学が注目されている。

例えば、パーキンソン病はドーパミン産生神経細胞の減少によって引き起こされるが、神経幹細胞などの移植によって運動性の向上などの治療効果を示唆する報告があり、その有用性が期待されている（Liu W.G. et al., *Parkins. Relate. Desord.* 13(2007)77; Soldner F. et al., *Cell* 136(2009)964）。胚性幹細胞（Embryonic stem cells; ES 細胞）は

倫理的問題を抱えていたが、人工多能性幹細胞（Induced pluripotent stem cells; iPS 細胞）からの神経幹細胞の作製が可能となったことで、細胞ソースの問題が解決したかのように思われている。さらに近年、成人皮膚の線維芽細胞から iPS 細胞を経由せず神経幹細胞の迅速かつ高効率に作製する方法も報告され、神経幹細胞移植の臨床応用は目前のごとく期待されている（Matsui T. et al., *Stem Cells* 30(2012)1109）。しかし実際には、分能が不安定な細胞の混入や、神経細胞以外の細胞への分化による移植幹細胞の癌化などが懸念されている。神経幹細胞を含む幹細胞は、その細胞外環境に応じて分化が誘導されるため、目的の細胞・組織に効率良く分化誘導さ

せるためには適切な細胞外環境の構築が重要である。神経幹細胞の場合、ニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイトなどへ分化する能力を有しており、先に例として挙げたパーキンソン病の場合は、移植した神経幹細胞がドーパミン産生ニューロンへの優先的に分化誘導されるような細胞移植用担体が必要となる。神経幹細胞の移植用担体として、キトサン、ヒアルロン酸やジェランガム（多糖）などよりなるハイドロゲルの利用が多く報告されているが、いずれも研究の範疇を超えるものではない。つまり、幹細胞研究が大きく先行しており、細胞移植用担体の開発は立ち遅れているのが現状である。

一方、外因性神経疾患治療に対しては、神経再生誘導管が自家神経移植に代わる治療法として期待されている。末梢神経再生も幹細胞移植と同じく、神経再生に適した細胞外環境の提供によって、その治療効果が向上すると考えられる。近年、日本でも認可され、臨床で使用できるようになった神経再生誘導管は、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体の織布でできたチューブ内に動物由来のコラーゲンスポンジを充填したものである。この誘導管は、前臨床試験でも優れた治療効果を示しており、今後の普及が多いに期待されている。しかし完全なものとは言えず、高純度とはいえ動物由来のタンパク質が用いられていることから生物学的危険性が懸念され、また織布よりなるため周囲および再生される神経

との癒着も強く疼痛が残る可能性がある。すなわち、内・外因性神経疾患の治療には、神経再生に特化した細胞外環境を構築できる、生体安全性に優れたマテリアルの開発が求められている。

これまでに我々は、神経再生医療への応用を目指して、神経再生性人工細胞外マトリクス（人工タンパク質）の生合成を試みてきた。この人工細胞外マトリクスは、エラスチン骨格の繰り返し配列（(VPGIG)<sub>n</sub>）(Yamaoka T. et al., *Biomacromolecules* 4(2003)1680) とラミニン-I由来配列 (AG73) (Nomizu M. et al., *J. Biol. Chem.* 273(1998)32491) を組み合わせたシンプルな構造であり、エラスチン配列に特徴的な温度応答性と AG73 の優れた神経再生促進性を兼備している。温度応答性とは、このタンパク質の水溶液が転移温度以上になると凝集して沈殿（コアセルベート）を形成する特性を意味しており、我々が生合成した人工細胞外マトリクスは生理的条件下においては不溶性である。そのため、末梢神経再生誘導管の素材として応用できると考えられる。また、この人工細胞外マトリクス水溶液を 10℃程度に冷却すると均一な溶液となるため、細胞の懸濁やシリンジでの体内への注入が容易で、注入後は体温によって凝集体を形成することで移植細胞をその部位に保持できるような新たな細胞移植用担体としての利用も考えられる。そこで本研究では、この人工細胞外マトリクスの内・外因

性神経疾患治療への応用の可能性を模索する。

本研究を遂行するに際し、人工細胞外マトリクスの大量発現系の確立は最初に克服すべき課題である。そこで初年度は、人工細胞外マトリクスの発現・精製条件の詳細な検討を行った。そして、得られた人工細胞外マトリクスの末梢神経再生誘導管用基材としての有用性を検証するために、ポリ乳酸との複合型ナノファイバー不織布をエレクトロスピンニング法で作製した。人工細胞外マトリクスの有用性を検証するために、不織布上でのラット副腎髄質褐色細胞腫 (PC12) 細胞の神経突起伸長を *in vitro* で評価した。さらに、人工細胞外マトリクスとポリ乳酸との複合ナノファイバーチューブを作製し、ウサギ脛骨神経に作製した欠損への移植実験も行った。

## B. 研究方法

### 1. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) の生合成

ラミニン-I 由来神経突起伸長活性配列 (AG73) とエラスチンの繰返し配列よりなる人工タンパク質 (*Histag*-RKRLQVQLSIRT-GRL-(VPGIG)<sub>30</sub>-VPLE; AG-VP) は、大腸菌発現系を用いて生合成した。AG-VP の発現株は、これまでに我々が作製したものをを用いた。フローズンストックから 2 x YT 培地で AG-VP 発現株を 5 mL のスモールスケールで一晩振盪培養する。その培養液を Overnight Express™ Autoinduction Systems

(Merck 社製) を含有した 2 x YT 培地 500 mL に加えて、30°C で一晩振盪培養することで AG-VP の発現を誘導した。大腸菌懸濁液を遠心 (3500 rpm, 15 分, 4°C) し、大腸菌ペレットを回収した。そこへ Urea 含有 Tris 緩衝液を大腸菌ペレット 1 g あたり 5 mL 加え、十分に懸濁させたのちに -80°C で凍結した。およそ 24 時間後、凍結した大腸菌懸濁液を解凍し、超音波ホモジナイザーで大腸菌を破菌した。碎菌後、溶液を遠心 (10000 rpm, 15 分, 4°C) して上清を回収し、0.8 μm のシリンジフィルターで濾過することで残渣を取り除いた。この溶液と His タグ精製用カラム (His-accept: ナカライ社製) とを 3:2 (v%) で混合し、4°C で一晩緩やかに攪拌することで AG-VP をカラムに吸着させた。その後、0.3 M-NaCl/リン酸緩衝溶液で洗浄し、10~500 mM のイミダゾールを含むリン酸緩衝溶液で順次、AG-VP を溶出させた。どの溶出液に AG-VP が含まれているかは、銀染色による SDS-PAGE で確認した。AG-VP が含まれていた溶液は、4°C にて透析 (MwCo: 10000Da) することで混入したイミダゾールを除去し、凍結乾燥することで高純度の AG-VP を得た。

### 2. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) -ポリ乳酸複合ナノファイバー不織布の作製

まず、ファイバー作成条件を最適化するため、市販の水溶性エラスチン

(エラスチン C : 和光純薬製) とポリ L-乳酸 (Mw : 10 kDa) との複合ナノファイバーを種々の条件で作成した。エラスチン C とポリ L-乳酸を 100/0、75/25、50/50、25/75、0/100 (質量比) とし、溶質濃度が 20 w/v% となるように 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノールで混合溶液を作製した。それぞれの溶液を、エレクトロスピン法を用いてナノファイバー不織布を作製した。エレクトロスピン法の条件は、印加電圧を -7.5 kV/+7.5 kV (電位差 15 kV)、溶液射出速度を 4 ml/h、ニードル-ターゲット間距離を 10 cm とした。得られたエラスチン C-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーのファイバー径ならび純水中での安定性を走査型電子顕微鏡観察によって評価した。

引続いて、ポリ L-乳酸 (Mw : 10 kDa) と AG-VP との質量比を 4 : 1 として、溶質濃度が 20 w/v% となるように 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノールで混合溶液を作製し、エレクトロスピン法でナノファイバー不織布を作製した。エレクトロスピン法の条件は、エラスチン C の場合と同様、印加電圧を -7.5 kV/+7.5 kV (電位差 15 kV)、溶液射出速度を 4 ml/h、ニードル-ターゲット間距離を 10 cm とした。併せて、AG-VP を含まないポリ L-乳酸ナノファイバー不織布、ならび AG-VP の代わりに AG73 ペプチド (RKRLQVQLSIRT) を同組成比でポ

リ L-乳酸に混合したナノファイバー不織布も作製した。それぞれのナノファイバー不織布のファイバー径、形状、およびリン酸緩衝溶液中での安定性についてそれぞれ走査型電子顕微鏡観察によって評価した。

### 3. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) -ポリ乳酸複合ナノファイバー不織布上での PC12 細胞の神経突起伸長活性の評価

神経幹細胞のモデルとして広く用いられているラット副腎褐色腫細胞 (PC12) は、ウシ胎児血清 (5 v%) とウマ血清 (10 v%) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; Invitrogen 社製) を用いて、ポリ D-リジンコーティング TCPS シャーレ中で継代培養を行った。0.05% トリプシン-EDTA (Invitrogen 社製) で細胞を剥離・回収後、神経増殖因子 (NGF) を含有する無血清分化用 DMEM 培地 (Apo-Transferrin Human (100  $\mu$ g/mL)、Insulin (4  $\mu$ g/mL)、Progesterone (20nM)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (30nM)、NGF (100ng/mL)) に細胞を分散し、通常の TCPS 上に播種し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 24 時間活性化させた。その後、通常の培養用培地に交換して 30 分後、ピペッティングで NGF によって活性化された PC12 細胞を回収し、遠心後に細胞懸濁液を得た。並行して前項の方法で作製した AG-VP-ポリ L-乳酸複合ナノファイバー不織布を 12  $\times$  12 mm 程度に裁断し、セルクラウ

ン (Scaffdex Oy 社製) に固定した。それを 24 ウェルプレート (IWAKI 社製) に挿入し、各ウェルに 1 mL のリン酸緩衝溶液を加えて 37°C で 30 分静置した。リン酸緩衝溶液をアスピレートし、1 mL の NGF 含有 DMEM 培地で試料を洗浄した。そこへ、NGF で活性化した PC12 細胞を  $1.0 \times 10^4$  cell/ml/well となるように播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 24 時間培養した。培養後、未接着の細胞をピペティングで洗浄し、接着細胞を 10 v %ホルマリン/リン酸緩衝溶液で 15 分間固定した。さらにリン酸緩衝溶液で洗浄後、接着細胞を 0.05% クリスタルバイオレット溶液で染色し、光学顕微鏡にて観察した。

#### 4. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) -ポリ乳酸複合ナノファイバーチューブの作製

3層構造よりなる AG-VP-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーチューブをエレクトロスピンニング法で作製した。まず、ステンレス棒 (φ 2.0 mm) をターゲットとし、AG-VP とポリ L-乳酸を複合させたナノファイバーを内層として紡糸した。その際、ポリ L-乳酸 (Mw: 10 kDa) と AG-VP との質量比を 4:1 とし、溶質濃度が 20 w/v% となるように 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノールで作製した混合溶液を、印加電圧を -7.5 kV/+7.5 kV (電位差 15 kV)、溶液射出速度を 0.5 ml/h、ニードル-ターゲット間距離を 10 cm の条

件で、エレクトロスピンニング法にて 5 分間紡糸した。次に、内層として L-ポリ乳酸の 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール溶液を、印加電圧を -7.5 kV/+7.5 kV (電位差 15 kV)、溶液射出速度を 3.0 ml/h、ニードル-ターゲット間距離を 10 cm の条件でエレクトロスピンニング法にて 30 分間紡糸した。最後に、外層としてポリ L-乳酸 (Mw: 10 kDa) とポリエチレングリコール (Mw: 20 kDa) との質量比が 9:1 の 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール溶液を、中層と同条件で 10 分間紡糸した。比較のために、内層にポリ L-乳酸のみ、およびポリ L-乳酸に AG73 ペプチドを混合させたものも同様に作製した。作製したナノファイバーチューブは、走査型電子顕微鏡によってそのファイバー形状などを観察した。

#### 5. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) -ポリ乳酸複合ナノファイバーチューブのウサギ腓骨神経欠損部位への移植と評価

前項で作製した AG-VP-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーチューブ (内径: 2mm, 長さ 2cm) を、ウサギ (NZW 種、2.8-3.0 kg、オス) の脛骨神経に作製した 2 cm の欠損部へ両端吻合することによって移植した (各群 3 羽ずつ)。その際、両端いずれも 1 mm ずつ内側へ引き込むようにして吻合した。麻酔下のウサギの坐骨神経を露出させ、腓腹神経、腓骨神



経、腓骨神経のそれぞれに分離後、腓腹および腓骨神経は切除して脛骨神経のみとしてから2 cmの欠損を作製した。同時に、比較のために自家神経（欠損作製時に回収した神経）も移植した。移植2ヵ月後に、チューブ移植部の近・遠位間の活動電位を測定し、チューブ内部の神経再生を評価した。

## C. 研究結果

### 1. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) の合成

AG-VP を500 mL スケールで発現誘導し、碎菌後、His-tag 用アフィニティーカラムに吸着させて、低濃度から高濃度イミダゾール緩衝溶液で段階的に溶出させ、SDS-PAGE でどのフラクションにAG-VPが含まれているかを評価した（図1）。その結果、イミダゾール濃度が40 mM以上で多くのAG-VPがカラムから遊離されてくることが分かり、精製にはイミダゾール濃度20 mMで洗浄し、100 mMで溶出する条件が最適と判断した。その条件で精製したところ、AG-VPを回収することができた（図2）。さらに、高分子量の不純物を除去するために限外ろ過（50 kDa）することで高純度のAG-VPを得ることができた（図3）。イミダゾールを除去するために透析し、凍結乾燥したところ、約50 mg/1 LカルチャーのAG-VPを得ることができた。

### 2. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) -ポリ乳酸複合ナノファイ

### バー不織布の作製

エラスチンCを用いた、タンパク質-ポリL-乳酸複合ナノファイバー作製条件の予備検討を行ったところ、いずれの組成比においてもファイバーを作製することができた（図4、表1）。ファイバー径は、エラスチンCもしくはポリL-乳酸いずれかの組成比が大きくなると太くなる傾向があった。それぞれのナノファイバーを純粋に浸漬したところ、エラスチンCのみでできたファイバーは水に溶解したものの、ポリL-乳酸と混合したものは溶解しなくなった（図5、表2）。エラスチンCの組成比が高いものは、浸漬後にファイバー径の縮小が認められたが、溶解や切断は見られず、エラスチンCがポリL-乳酸に均一に混合されていることが示唆された。

ポリL-乳酸（Mw：10 kDa）とAG-VPとの質量比を4：1の条件で作製したナノファイバーを作製したところ、径が840 nm程度の均一なファイバーを紡糸することができた（図6）。ポリL-乳酸のみ、およびポリL-乳酸とAG73ペプチドを複合させたナノファイバーと比較すると、AG-VP-ポリL-乳酸複合ナノファイバーの径が最も細くなった。エレクトロスピニングで紡糸されるファイバーの物性は、射出する溶液の電荷および粘度に大きく影響されることが知られており、AG-VPを混合することでそれら溶液特性に変化が生じたものと考えられる。また、それぞれのナノファイバー不織布をリン酸緩衝溶

液に浸漬させたところ、AG73 ペプチド-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーのみが浸漬後、部分的に蛇行するような形状の変化が認められた。これは、AG73 ペプチドが溶出したためと考えられる。一方、AG-VP-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーは一切の形状変化が見られなかった。この結果より、AG73 ペプチド-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーでは生理的環境下においてペプチドの早期溶出が懸念されるが、AG-VP-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーでは長期安定に機能を発現できることが期待される。

### 3. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) -ポリ乳酸複合ナノファイバー不織布上での PC12 細胞の神経突起伸長活性の評価

各ナノファイバー不織布上での PC12 細胞の接着および神経突起伸長を評価した (図 7, 8)。ところ、ポリ L-乳酸のみのナノファイバー不織布上では接着した PC12 細胞の 30%ほどしか短い神経突起 ( $20\ \mu\text{m}$  以下) を有する細胞が存在しなかった。しかし、AG73 ペプチドを複合させたものでは、接着数はポリ L-乳酸のみとほぼ同様であったものの、接着細胞の 10%ほどが長い神経突起 ( $20\ \mu\text{m}$  以上) が見られた。これらと比較して、AG-VP を複合したナノファイバー上では、細胞の接着数も優位に増加し、そのうちの約 70%以上が神経突起を有していた。これらの結果より、AG-VP をポリ L-乳酸に安定に複合さ

せることによって神経突起伸長活性が付与されていることが示唆された。

### 4. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) -ポリ乳酸複合ナノファイバーチューブの作製

作製した各ナノファイバーチューブの走査型電子顕微鏡観察像および形状の詳細を図 9 に示す。いずれの組成のチューブも、断面は層構造を形成しており、内層および外層は均一なファイバーとなっていた。AG-VP-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーチューブのファイバー径は、内層で約  $800\ \text{nm}$ 、外層が約  $1.9\ \mu\text{m}$  であった。各チューブをリン酸緩衝溶液に 24 時間浸漬させた後に形状を観察したところ、AG-VP-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーチューブでは内層・外層共に溶解など見られずファイバーの形状は保持されていた (図 10)。

### 5. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) -ポリ乳酸複合ナノファイバーチューブのウサギ腓骨神経欠損部位への移植と評価

作製した各ナノファイバーチューブを長さ  $2.2\ \text{cm}$  に裁断し、ウサギの脛骨神経に作製した  $2.0\ \text{cm}$  の欠損部位に移植した (図 11, 12)。いずれのチューブも 8-0 プロリン糸で容易に縫合できる強度を有していた。移植 2 ヶ月後に移植箇所を露出させたところ、自家神経は周辺の結合組織の癒着が激しく、適切な形状で神経は再生していなかった。一方、ナノ

ファイバーチューブを移植した各群では、周辺組織の癒着もそれほど酷いものではなく、容易に露出させることができた。チューブ両端（近位および遠位）の神経を丁寧に露出させ、その間の活動電位を測定した（図13-15、表3）。その結果、AG-VP-ポリL-乳酸複合ナノファイバーチューブの場合、健全な脛骨神経には遠く及ばなかったものの、ポリL-乳酸のみおよびAGペプチドを複合したナノファイバーチューブと比較して活動電位のピーク強度は大きく、かつその時間も早くなっていた。AG-VPの効果によって、AG-VP-ポリL-乳酸複合ナノファイバーチューブ内部で神経再生が促進されたものと考えられる。

#### D. 考察

神経再生性人工細胞外マトリクス（AG-VP）の最適な発現条件を設定することができた。一般的なりコンビナントタンパク質の発現は、大腸菌の至適温度である37℃で行われるが、AG-VPの発現は30℃が適当であった。これは、AG-VPが生理的環境下でも15℃付近を境に高温になると凝集する特徴があるため、低温培養での緩やかな発現誘導が大腸菌への負担を軽減したためと推察される。

現状の収量（約50mg/1Lカルチャー）ではAG-VPのみを担体として用いることは量的な問題から難しく、ポリL-乳酸などの汎用性の生体分解吸収性高分子材料との複合化が適当と考え、AG-VP-ポリ乳酸複合ナノフ

ァイバーの作製とその末梢神経再生誘導管への応用について検討した。予備検討としてエレクトロスピニング法で作製したエラスチンCとポリL-乳酸との複合ナノファイバーは、興味深いことに75w%がエラスチンCのナノファイバーを水に浸漬しても、径は細くなったものの溶解せずにファイバーの形状を維持していた。エラスチンCとポリL-乳酸が均一に分布した場合は溶解することが予想され、この結果はエラスチンCがポリL-乳酸のファイバー周囲に存在していたことを示唆している。エラスチンC中に存在するVPGVG配列の繰り返しなど、疎水性ブロックがポリL-乳酸と相互作用しているものと考えられる。

ポリL-乳酸（Mw：10kDa）とAG-VPとの質量比を4：1として作製したナノファイバーも、エラスチンCと同様に、水に浸漬させてもファイバーの形状を保持していた。同組成比でAG73ペプチドを複合させたナノファイバーの場合は、水に浸漬されると部分的な変形や溶解が見られたことから、AG-VPはポリL-乳酸と安定に相互作用していると考えられる。

AG-VPとポリL-乳酸との複合ナノファイバー不織布上でPC12細胞の接着および神経突起伸長が促進されたことと併せて考えると、ポリL-乳酸ファイバーをコーティングするようにAG-VPが固定されていることが示唆された。また、AG73ペプチドを複合させたファイバーよりもPC12細胞に対する活性が高かったことから、

固定された AG-VP が培地中でも安定に保持されて機能していることが示された。

AG-VP が複合されたポリ L-乳酸ナノファイバーを内層に有するチューブをウサギ脛骨神経の欠損部へ移植した評価では、僅かではあるが移植 2 か月後の活動電位の強度および伝達速度の向上、すなわち神経再生の促進が認められた。今回の内腔 AG-VP 複合ポリ L-乳酸ナノファイバーは、配向性が不規則であった。PC 1 2 細胞の実験で見られたように、神経突起はファイバーに沿って伸長する傾向がある。一層の神経再生性の向上には、ファイバーの配向性を整えるなどの工夫が必要と考えられる。

## E. 結論

本研究課題の初年度では、神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) の発現条件の最適化を完了した。現状の発現量は必ずしも満足するものではないため、コンスロラクト (発現用のプラスミド DNA) の再設計を並行して検討する必要がある。さらに、末梢神経再生誘導管への応用を志向し、AG-VP とポリ L-乳酸の複合ナノファイバー不織布よりなるチューブを製作することができた。このチューブをウサギ脛骨神経欠損 (2 cm) に移植したところ、僅かな神経再生の促進が見られた。一層の機能向上のためには、ファイバーの配向性や AG-VP の複合組成比などを検討する必要がある。

次年度は、これらの課題に取り組む

と共に、細胞移植用担体としての可能性を模索する。細胞移植用担体 (補助剤) の場合、神経再生誘導管と比較すると使用する AG-VP 量が大幅に小さくなると考えられ、現状の発現量でも評価を進めることができる。

引続き、神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) を用いた中枢神経疾患治療のための細胞移植用担体と、末梢神経疾患治療のための神経再生誘導管の開発を遂行する。

## F. 健康危険情報

本研究課題では遺伝子組み換え大腸菌を取り扱っているが、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律施行規則」及び「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」等に基づいて遂行しており、研究者および第三者への健康被害等は一切生じていない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 総説・著書等

- 1) 山岡哲二、柿木佐知朗: 再生医療のための繊維材料修飾とその評価、繊維と工業, 68(11): 314-318, 2012.

### 3. 学会発表

- 1) 柿木佐知朗、山岡哲二、ポリ乳酸／人工細胞外マトリクス複合型機能性神経誘導管を用いた末梢神経再生、第11回日本再生医療学会総会（2012年6月13日、横浜）[国内学会、口頭発表]
- 2) 柿木佐知朗、山岡哲二、人工ペプチド・人工タンパク質を用いたポリ乳酸スキャホールドの機能化と末梢神経再生医療への応用、第61回高分子討論会（2012年9月21日、名古屋）[国内学会、口頭発表]
- 3) 柿木佐知朗、中山みどり、森反俊幸、山岡哲二、神経疾患治療用担体を志向したエラス

チン様人工タンパク質の機能評価、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012（2012年11月27日、仙台）[国内学会、ポスター発表]

- 4) 中山みどり、柿木佐知朗、森反俊幸、山岡哲二、ラミニン/エラスチン模倣人工細胞外マトリクスとポリ乳酸を複合化したナノファイバーの神経誘導管への応用、第12回日本再生医療学会総会（2012年3月22日、横浜）[国内学会、ポスター発表]

### H. 知的財産権の出願・登録情報 該当なし

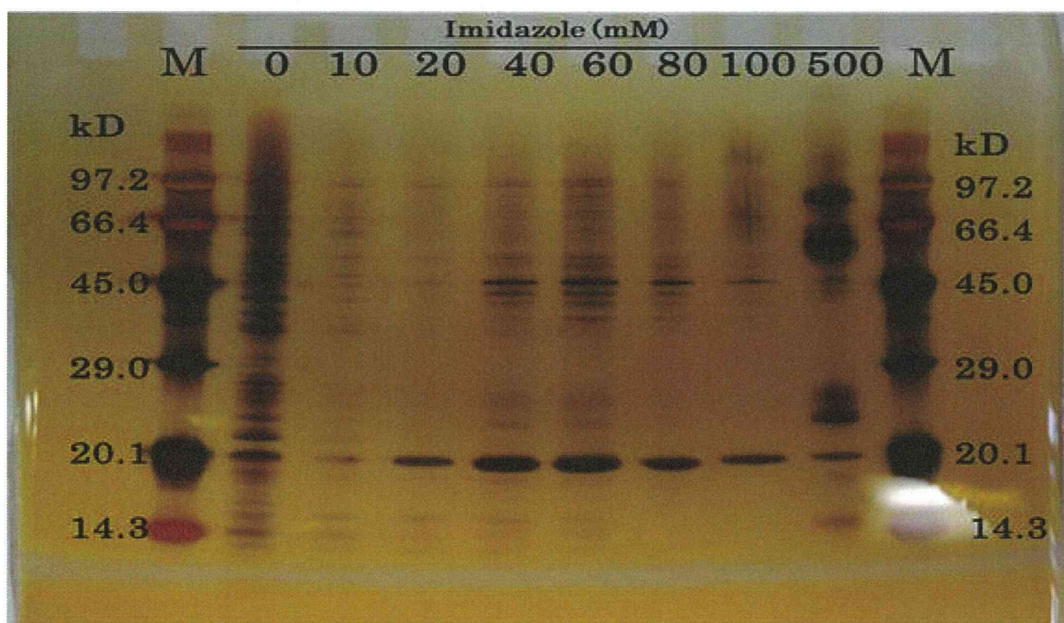


図1. 様々なイミダゾール濃度のリン酸緩衝溶液を用いて His タグアフィニティカラムから溶出させた AG-VP の SDS-PAGE

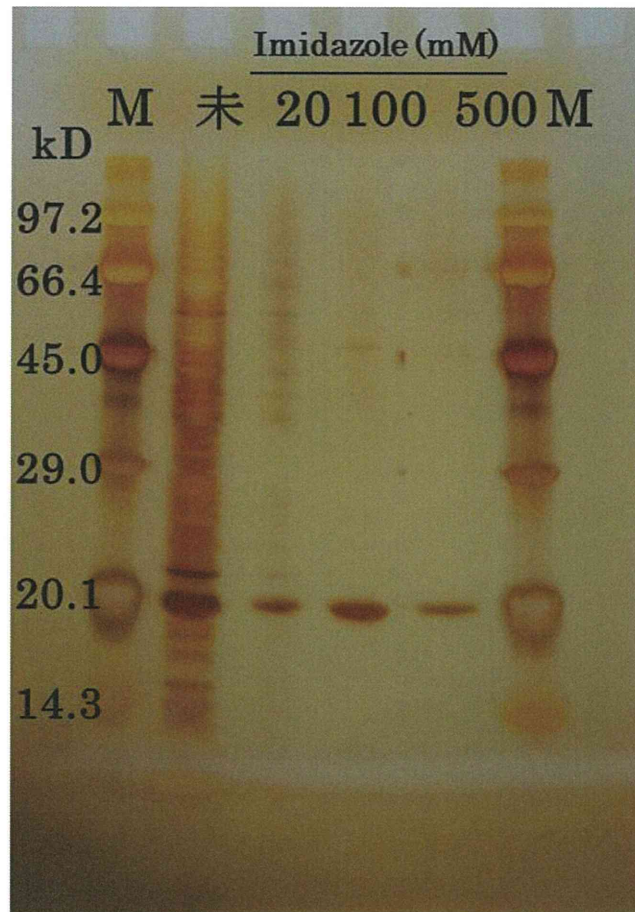


図2. 最適化した条件で精製した AG-VP の SDS-PAGE

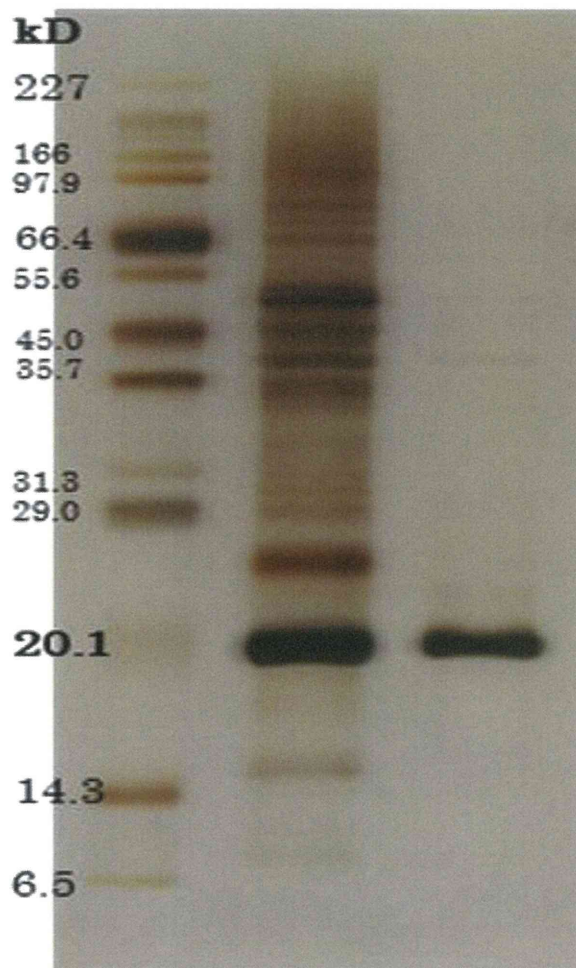
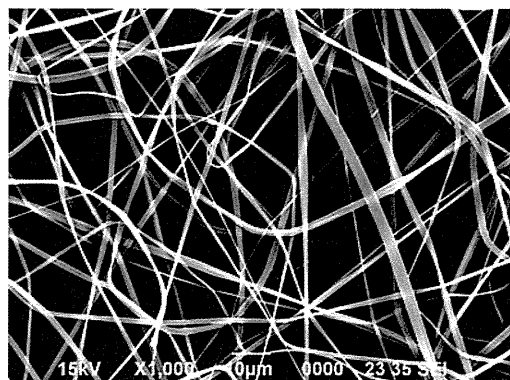


図 3. 限外濾過後に得た高純度 AG-VP の SDS-PAGE

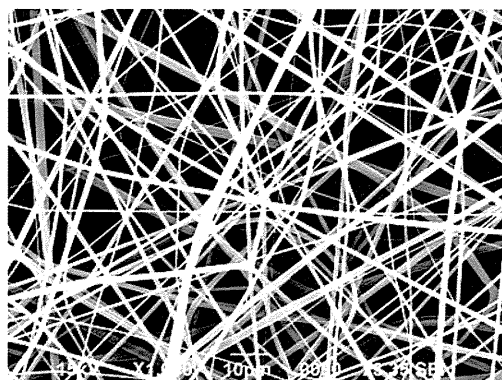


# Elastin-C / ポリL-乳酸

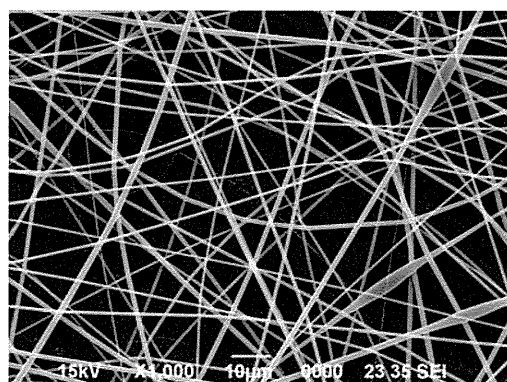
100/0



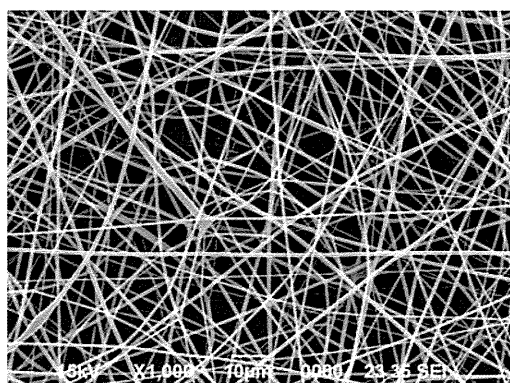
75/25



50/50



25/75



0/100

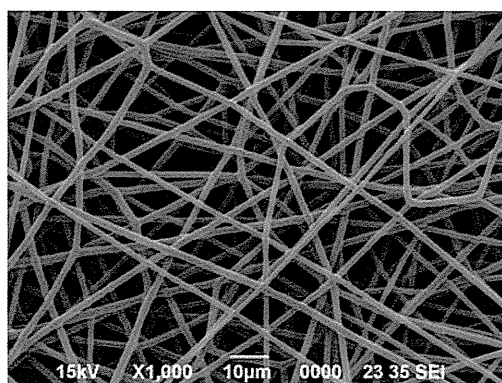


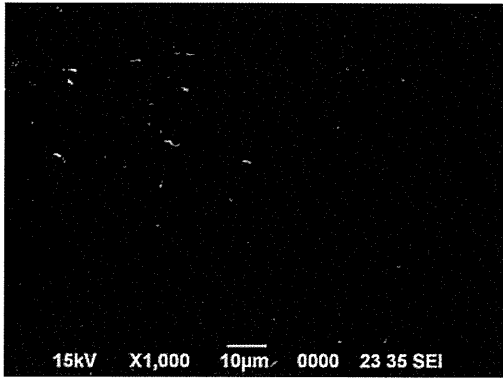
図4. 様々な組成で電界紡糸したエラスチンC—ポリL-乳酸複合ナノファイバーの走査型電子顕微鏡像

表 1. 様々な組成で電界紡糸したエラスチン C—ポリ L-乳酸複合ナノファイバのファイバー径

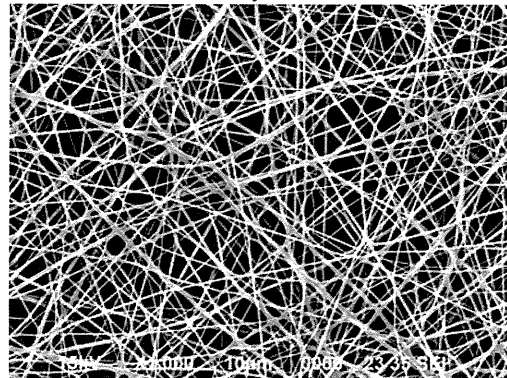
Elastin-C / ポリL-乳酸 (w/w)	ファイバー径 ( $\mu\text{m}$ )
100 / 1	$1.29 \pm 0.67$
75 / 25	$1.36 \pm 0.49$
50 / 50	$0.88 \pm 0.36$
25 / 75	$0.92 \pm 0.29$
0 / 100	$1.83 \pm 0.26$

## Elastin-C / ポリL-乳酸

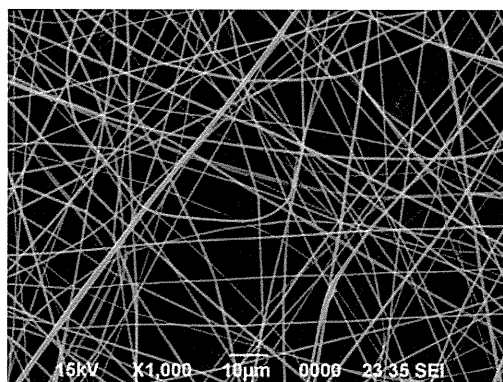
100/0



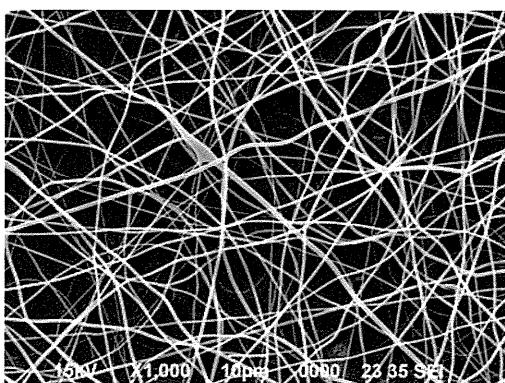
75/25



50/50



25/75



0/100

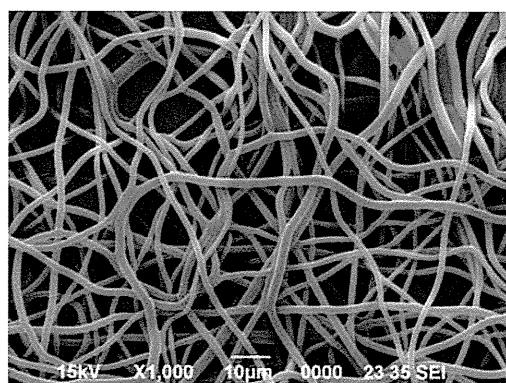


図5. 様々な組成で電界紡糸したエラスチン C-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーの浸水後の走査型電子顕微鏡像

表 2. 様々な組成で電界紡糸したエラスチン C—ポリ L-乳酸複合ナノファイバーの水浸後のファイバー径

Elastin-C/ ポリL-乳酸 (w/w)	ファイバー径 ( $\mu\text{m}$ )
100 / 1	-
75 / 25	$0.79 \pm 0.29$
50 / 50	$0.67 \pm 0.17$
25 / 75	$0.75 \pm 0.28$
0 / 100	$1.87 \pm 0.53$