

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 細胞などから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、生体内の組織再生を誘導する最適な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より、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、神経幹細胞の移植や末梢神経の再生などの組織再生医工学的なアプローチが注目されている。

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、神経幹細胞の移植によって患者の運動能力が向上するという報告があり、幹細胞移植治療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)。さらに、倫理的問題

の少ない人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) から神経幹細胞の作製が可能となったことで、細胞ソースの問題はほぼ解決した。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、分化能の不安定な細胞の混入や、神経細胞以外への分化による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答して分化が誘導されるため、目的の細胞ならび組織に効率良く分化誘導するためには、それに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。幹細胞の分子生物学的な研究が大きく先行しており、細胞移植用担体の開発など材料分野の研究は立ち遅れているのが現状である。

一方、重篤な外因性神経疾患の治療において、神経再生誘導管が自家神経移植に代わる治療法として注目されている。吻合できない重篤な末梢神経障害が生じた場合、これまで肺腹神経などを自家神経移植が適用されていた。しかし、ドナー神経の確保や摘出部位の知覚不全、さらに移植後の再生不良や過誤支配といった合併症が問題であった。そのため、古くはシリコーンチューブなど、人工材料からなる神経誘導管の開発が進められてきた。先述の幹細胞移植と同じく、適した細胞外環境を人工的に構築しなければ末梢神経再生は達成されない。日本では、2013年にポリ乳酸-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神経再生誘導管が

認可され、臨床において5cmまでの神経欠損の治療に用いられている。この神経誘導管の臨床成績は良好で、益々の普及が期待されている。しかし、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、また織布によ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人工マテリアルの開発が求められる。

これまでに我々は、神経再生医療への応用を志向した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)_n)(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)を組み合わせた単純な構造であり、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不溶化(コアセルベート)する特性のことで、我々の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、長期間の埋入にも耐えうる末梢神経再生誘導管の素材として有用と考えられる。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、細胞の懸濁液の調製やシリジでの体内への注入が容易で、注入後は体温によって不溶化し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ことを目的として、平成24年度に開始した。

平成24年度に、我々が既に保有していた発現用大腸菌クローニーからのラミニン-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)₃₀-VPLE*; VP-AG) 大量発現系の確立と、ポリ乳酸との混合マイクロファイバーの作製に成功した。また、VP-AG/ポリ乳酸混合マイクロファイバー上で PC12 細胞の突起伸長の亢進が認められた。そこで、さらなるステップとして、VP-AG/ポリ乳酸混合マイクロファイバーを内層にもつ神経誘導管 (内径 2 mm) を作製し、ウサギ脛骨神経に作製した 2 cm の欠損へ移植した。2カ月後、神経誘導管内部の末梢神経の再生を電気生理学的に評価したところ、VP-AG を混合することによる神経再生の亢進作用はごく僅かなものであった。また、外観観察で縫合部において神経様組織がチューブ外に増殖している様子も一部で確認された。そこで、前年度(平成25年度)は VP-AG/ポリ乳酸混合

マイクロファイバー神経誘導管の内径を 2 mm から 3 mm に拡張して神経組織の外部への増殖を防止し、かつ移植期間を 2 カ月から 3 ヶ月に延長することで、VP-AG の混合による末梢神経再生の亢進性をより詳細に評価した。その結果、平成24年度と同じく VP-AG を混合することによる神経再生の亢進作用はごく僅かであった。すなわち、VP-AG は PC12 細胞に対しては突起伸長活性を示したもの、*in vitro* における軸索伸長を亢進する能力を備えていないと判断し、新たな人工タンパク質の設計と合成に着手した。

前年度中に、エラスチン様繰り返し配列の構造骨格 (VPGIG)₃₀-(VPGIG)₃₀ をコードした発現用ベクターの作製まで至った。引続いて、本年度はその骨格へのラミニン由来 IKVAV 配列の導入を検討した。タンパク質 1 分子あたりの活性配列数を増加させることで、神経再生活性の向上を計った。さらに、新たな人工タンパク質とポリ乳酸とを混合したマイクロファイバーの配向化を検討した。初年度の PC12 細胞を用いた評価の結果、軸索がファイバーに沿って伸長している様子が観察されたことを踏まえて、ファイバーを神経軸索と平行に配向にすることで、神経の再生が促進されると考えた。さらに配向化した人工タンパク質/ポリ乳酸混合マイクロファイバー上でのラット DRG ニューロンの突起伸長も評価した。

B. 研究方法

1. 新規人工細胞外マトリクス (IKVAV-(VPGIG)₆₀) (IK-VP) の生合成

昨年度に得た (VPGIG)₆₀ 発現用ベクター (pET19b(VPGIG)₆₀) へのラミニン鎖ドメイン由来 IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) 配列 (Tashiro K. et al., *J.Biol.Chem.* 265(1989)16174) の導入を検討した。pET19b(VPGIG)₆₀ には、図 1 (A) のように 2 つの (VPGIG)₃₀ をコードした DNA の両端および中央部に活性配列を導入するための制限酵素切断サイト (NdeI, SalI および XhoI) を設けてある。まず、NdeI 部分への IKVAV 配列をコードした DNA (図 1 (B)) の挿入を検討した。pET19b(VPGIG)₆₀ を制限酵素 NdeI (FastDigest; Life technologies) で切断し、アガロース電気泳動からの切り出しによって精製後、脱リン酸化 (E. coli. Alkaline phosphatase; TOYO BO) した。DNA をフェノールで抽出、エタノール沈殿した後に、TNE 緩衝液に溶解させた。併行して、IKVAV をコードしたオリゴ DNA をリン酸化 (ATP/T4 Polynucleotide kinase; TOYOBO) して精製後、TNE バッファーに溶解した。アニーリングした IKVAV コードオリゴ DNA と NdeI で切断された pET19b(VPGIG)₆₀ とを混合し、ライゲーション (Ligation high; TOYOBO) した。ライゲーション反応後の溶液の DNA 濃度を吸光度計 (=260nm) で定量し、所定量の DNA を使用して DH5⁺ コンピテントセルをコールドショック法で形質転

換した。その後、大腸菌の分散液を寒天培地 (アンピシンを含む) 上に播種した。およそ 24 時間、37℃ のドライインキュベーター内で培養し、コロニーの有無を確認した。数コロニーをピックアップし、アンピシリンを含む SOC 培地で培養後、スピンカラムでプラスミド DNA を精製した。得られた DNA を NdeI および XhoI で切断し、得られるフラグメントのアガロースゲル電気泳動の結果から IKVAV コード DNA の導入を評価した。

IKVAV-(VPGIG)₆₀ (IK-VP) 発現用ベクター (pET19b(IK-VP)) を大腸菌 (Rosetta 株) にコールドショック法で形質転換し、その発現用クローン (Rosetta (IK-VP)) を得た。Rosetta (IK-VP) を 5mL の 2xYT 培地で一晩振盪培養した。それをスターターとして、Overnight ExpressTM Autoinduction System (Merck 社製) を含む 500mL の 2xYT 培地 (アンピシリン・クロラムフェニコール含有) に加えて、30℃ で 24 時間培養、IK-VP を発現誘導した。大腸菌懸濁液を遠心 (3500 rpm, 15 分, 4℃) 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 1gあたり 5mL 加え、充分に懸濁させたのちに -80℃ 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℃) して上清を回収し、0.8 μm のシリング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 : ナカラライ社製) とを 3 : 2 (v%) で混合し、4 で一晩緩やかに攪拌することで IK-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、20、50、250 および 500 mM のイミダゾールを含むリン酸緩衝溶液で順次、IK-VP を溶出させた。溶出した水溶液を SDS-PAGE で泳動し、CBB 染色および銀染色によって含有タンパク質の分子量を確認した。その後、4 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、凍結乾燥した。

2. 配向性 IK-VP - ポリ乳酸混合マイクロファイバーの作製

いずれのマイクロファイバーも、前年度と同様にエレクトロスピニング法で作製した。まず、ポリ L- 乳酸 (Mw=106000; 武藏野化学研究所) のみを用いてマイクロファイバーの配向化条件を検討した。円板型ターゲット (直径 140 mm × 厚さ 6 mm) を高速に回転し、ファイバーを巻き取ることで配向の揃ったマイクロファイバーの作製を検討した。濃度が 10, 15 および 20 % となるようにポリ L- 乳酸をの濃度を 1,1,1,3,3,3- ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) で溶解した。印加電圧を ±4.0 ~ 5.0 kV (電位差 8.0 および 10.0 kV) 溶液射出速度を 2.0 ml/h 、ニードル - ターゲット間距離を 10 cm とし、円板の回転数を 200 ~ 12

50 rpm と変化させた時のファイバーの配向性を走査型電子顕微鏡で観察した。また、最適化した条件で内層が配向マイクロファイバーのチューブを試作した。

さらに、ポリ L- 乳酸で配向ファイバーを作製できた条件で、(VPGIG)₆₀ (VP) および IK-VP のみでなるファイバーの作製を検討した。両タンパク質を 10 % となるように HFIP に溶解し、円板型ターゲットを用いてマイクロファイバーを作製した。さらに、マイクロファイバーをリン酸緩衝溶液 (PBS) に浸漬させ、溶液中での安定性を確認した。

ポリ L- 乳酸と VP もしくは IK-VP を混合したマイクロファイバーの配向化も検討した。ポリ L- 乳酸と VP もしくは IK-VP を等量混合し、20% (それぞれ 10 %) の HFIP 溶液を調製した。ニードル - ターゲット間距離やターゲットの回転速度を変化させてエレクトロスピニングすることで、最もマイクロファイバーの配向が揃う条件を模索した。さらに、得られた混合マイクロファイバーを PBS に浸漬させ、その安定性も評価した。

3. 配向性 IK-VP - ポリ乳酸混合マイクロファイバー上のラット DRG ニューロンの接着と突起伸長挙動の評価

ポリ L- 乳酸と VP もしくは IK-VP を混合した配向性マイクロファイバー不織布上でのラット後根神経節 (DRG) ニューロン (Lonza) の接着お

および突起伸長を評価した。

ポリ L-乳酸と VP もしくは IK-VP を混合した配向性マイクロファイバー不織布を Cell culture slide (SPL 社) に固定した。各ウェルにラット DRG ニューロンを 200 個播種し、SingleQuotsTM を添加した PNGMTM 初代神経細胞増殖培地 (いずれも Lonza) を用いて 72 時間培養した。その後、4 % ホルムアルデヒドで接着した DRG ニューロンを固定化し、メタノールでの膜透過処理と 5 % ヤギ血清 / 0.3 % Triton-X を含む PBS によるブロッキングを経て、Neurofilament を免疫染色で可視化した。免疫染色は、Alexa Fluor[®] 594 で蛍光ラベルされた Neurofilament-L Rabbit mAb (Cell signaling technology 社) を用いて行った。1 次抗体として、を 2 次抗体として用いた。各試料上のラット DRG の形態を、共焦点レーザー顕微鏡および走査型電子顕微鏡用で観察した。

C. 研究結果

1. 人工細胞外マトリクス (IK-VP) の生合成

まず、pET19b(VPGIG)₆₀ の NdeI および XhoI 切断性をアガロース電気泳動で確認した (図 2)。その結果、NdeI および XhoI でのみ切断した場合は僅かにバンドが低分子側へ移動し、NdeI と XhoI の両方で切断すると約 500 bp のフラグメントが認められた。このことから、NdeI および XhoI でベクターの 1 か所のみが切断

されることを確認した。続いて、IKVAV をコードしたオリゴ DNA (相補鎖) を混合して 98 - 15 分でアニール後、30 ℃ まで徐冷することで二重鎖オリゴ DNA を調製した (図 3)。相補 DNA の混合溶液とそのアニーリング後のアガロース電気泳動の結果、混合するのみで一本鎖 DNA よりもバンドが高分子側へ上昇したことから、二重鎖の形成にアニーリングを要しないことが分かった。その後、NdeI で切断された pET19b(VPGIG)₆₀ と IKVAV コード二重鎖オリゴ DNA とを混合してライゲーション後、その DNA を用いて大腸菌コンピテントセル (DH5[®]) を形質転換した。寒天培地 (アンピシンを含む) 上に播種したところ、24 時間後におよそ 10 個のコロニーを認めた。全てのコロニーを回収して 5 mL の SOC 培地 (アンピシン含む) で培養後、DNA を回収した。しかし、NdeI/XhoI 切断で生じるフラグメントの長さは、ライゲーション前後で同様であったことから、得られたコロニーにはセルフライゲーションした pET19b(VPGIG)₆₀ が導入されていることが示唆された。本方法での pET19b(VPGIG)₆₀ への IKVAV コードオリゴ DNA の導入が困難であると判断し、ミューテーション法による pET19b(VPGIG)₆₀ への IKVAV コードオリゴ DNA の導入を外部業者へ委託した。

委託合成了
pET19b(IKVAV-(VPGIG)₆₀)
(pET19b(IK-VP)) をクローニング用

大腸菌株(DH5 α)および発現用大腸菌株(RosettaTM(DE3)pLysS)にそれぞれ導入した。いずれも5コロニーをピックアップして培養後、プラスミドベクターを抽出・精製し、NdeIおよびXhoI切断してからアガロース電気泳動でフラグメント長を確認した(図4)。その結果、回収したすべてのプラスミドベクターにおいて1021bpのフラグメントを確認できたことから、pET19b(IK-VP)で形質転換されたクローニングおよび発現用大腸菌株が得られたことが示された。

続いて、発現用大腸菌株(pET19b(IK-VP)で形質転換されたRosettaTM(DE3)pLysS)からIK-VPの発現を誘導した。得られた大腸菌の破碎液をSDS-PAGEで泳動したところ、IK-VP(Mw=33911Da)に由来する濃いバンドが確認された(図5)。さらに、Hisタグ精製用カラムを用いてIK-VPを吸着・溶出させたところ、50および250mMのイミダゾールを含むバッファーで溶出した区画にIK-VPのみが存在し、高純度のIK-VPを得ることをできた(図6)。最終的には、約120mg/1L培養の大量発現系を確立することができた。

2. 配向性IK-VP-ポリ乳酸混合マイクロファイバーの作製

まず、ポリL-乳酸のみを用い、溶液濃度を10, 15および20w%、ターゲット-ニードル間を10cm、印加電圧を ± 5.0 および ± 4.0 kVとして円盤型ターゲットへ電界紡糸

した(図7)。その結果、ポリL-乳酸の濃度が10%ではファイバーにならず、15%ではビーズが混在したファイバーに、20%で均一なファイバーが形成された(図8)。その配向は、印加電圧が ± 5.0 kVではランダムであったが、 ± 4.0 kVにすると溶液濃度が20%のファイバーでターゲットの回転方向に配向した。

さらに、20%のポリL-乳酸溶液をドラム型および円板型ターゲットを用いて、様々な回転速度で電界紡糸した。その結果、ドラム型では1250rpmで高速回転させると配向が揃った。一方の円板型では、500rpmでほぼ配向が揃い、より高速に回転させると均一性が向上した(図9)。

ドラム型ターゲット(1250rpm)で作製した配向性マイクロファイバー不織布をステンレスチューブに巻き付け、それをターゲットとニードルの間に設置してポリL-乳酸を電界紡糸することで、長軸方向にファイバーが配向した内層を持つチューブの作製できることも確認した(図10)。

ポリL-乳酸で最適化した配向性ファイバー作製条件を基に、(VPGIG)₆₀(VP)およびIK-VPのみでの配向性マイクロファイバーの作製を試みた。10%のVPもしくはIK-VPのHFIP溶液を円板型ターゲット(1000rpm)に印加電圧 ± 5.0 kVで電界紡糸したところ、いずれもおおよそ配向の揃ったマイクロファイバーを作製することができた(図11)。マイクロファイバーの直径は、IK-VPの方

が細くなる傾向があった。これは、タンパク質中のカチオン性残基数が多くなったためと考えられる。得られたVPおよびIK-VPマイクロファイバーを室温(25)および37のPBSに3時間浸漬させ、その安定性を評価した。その結果、VPでは25および37いずれでもファイバーが完全に溶解していた(図12)。一方のIK-VPは、25では部分的なファイバーの溶着が認められた。37ではファイバーの形状を保持していたものの、ファイバーの径が大きくなつた。これは、ファイバーがPBSに浸漬されることで膨潤したことを示唆している。そこで、アニーリングによるファイバーの構造安定化を図った。VPおよびIK-VPマイクロファイバーを60で48時間アニール後、37のPBSに24時間浸漬して安定性を評価した。その結果、VPマイクロファイバーでは、アニーリングの有無に関係なく溶解した。一方のIK-VPもアニールの効果は認められず、アニーリングしたものもファイバーの溶着と膨潤が認められた(図13)。すなわち、VPおよびIK-VPのみで作製したファイバーは、PBS中で安定に保持できないことが分かった。

そのため、昨年度と同じく、VPもしくはIK-VPとポリL-乳酸を混合した配向性マイクロファイバーの作製を検討した。VPもしくはIK-VPとポリL-乳酸をそれぞれ10%としたHFIP溶液を、それぞれの回転速度、ニードル-ターゲット間距離および印

加電圧で円板型ターゲットへ電界紡糸した。その結果、VPとポリL-乳酸を混合した場合、ターゲット回転速度1300 rpm、印加電圧±6.0 kV、ニードル-ターゲット間距離15 cmの条件で配向性ファイバーを作製できた(図14)。ターゲットの回転速度が1000 rpmではファイバーの配向は揃わず、また1300 rpmでも印加電圧が±7.5 kVでは配向が乱れ、±5.0 kVではファイバーの噴射量(紡糸量)が少なくなった。同様に、IK-VPとポリL-乳酸の混合マイクロファイバーの作製も検討した。その結果、VPと同じく、ターゲット回転速度1300 rpm、印加電圧±6.0 kV、ニードル-ターゲット間距離15 cmで最も配向したマイクロファイバーが作製された(図15)。印加電圧が±7.5 kVと大きい場合は、ファイバーの径が細くなり、配向が乱れた。最適化した条件で作製したVPもしくはIK-VPとポリL-乳酸との混合マイクロファイバーを37のPBSに24時間浸漬させて、その安定性を評価した(図16)。その結果、いずれもファイバーの形状は変化せず安定に保持されていたことから、引き続く細胞実験等にはこの混合マイクロファイバーを用いることとした。

3.配向性IK-VP-ポリ乳酸混合マイクロファイバー上でのラットDRGニューロンの接着と突起伸長挙動

それぞれ最適化した条件で30分

間紡糸することでポリ L-乳酸のみ、ポリ L-乳酸と VP もしくは IK-VP を混合した配向性マイクロファイバーを作製し、Cell Culture Slide に挟み込んで固定した（図17）。その上に、播種したラット DRG ニューロンを 72 時間培養後、Neurofilament を免疫染色で可視化した（図18）。その結果、ポリ L-乳酸のみおよび VP とポリ L-乳酸を混合したマイクロファイバー上では球状に接着したラット DRG ニューロンが僅かに観察されたのみであった。一方、IK-VP とポリ L-乳酸を混合したマイクロファイバー上では、ラット DRG ニューロン接着数が増加し、かつニューロフィラメント陽性の長い軸索がファイバーの配向に沿って伸長している様子が見られた。

また、72 時間培養後の試料表面のラット DRG ニューロンの接着形態を走査型電子顕微鏡で観察したところ、IK-VP とポリ L-乳酸を混合したマイクロファイバー上でのみ、ラット DRG ニューロンが一本のファイバー上に接着し、その配向に沿って軸索を伸長している様子が認められた（図19）。

D. 考察

平成25年度に新たに作製したエラスチン様繰り返し配列骨格を持つVPにラミニン由来神経突起伸長活性IKVAV配列を導入したIK-VPを大腸菌発現システムで生合成することができた。また、発現条件を最適化す

ることで約 120 mg/1 L 培養の大 量発現系を確立できた。

昨年度までの結果を踏まえて、本年度は、配向の揃ったマイクロファイバーの作製を詳細に検討した。IK-VP のみでマイクロファイバーを作製することが最も理想的と考えているが、タンパク質のみでは PBS に浸漬させた際に部分的な溶着やファイバーの膨潤が認められた。そのため、昨年度までと同じく、ポリ L-乳酸との混合系を採用した。VP と IK-VP 共に、ポリ L-乳酸に複合させることで、生理的環境下における安定性が飛躍的に向上した。ポリ L-乳酸との疎水的な相互作用や、結晶間の相互作用によるものと推測される。また、高回転の円板型ターゲットを用いた電界紡糸によって、配向性の揃ったポリ L-乳酸のみおよび、VP もしくは IK-VP とポリ L-乳酸との混合マイクロファイバーを作製できた。印加電圧が ± 7.5 kV 以上になると直徑の細い配向の乱れたファイバーが紡糸された。試料溶液の噴射速度（電位差が大きい方が速く移動）が速いと、ターゲットの最高回転速度（1300 rpm）では巻き取りが追いつかないため、配向が乱れたと考えられる。

さらに、IK-VP とポリ L-乳酸との混合マイクロファイバー上でのみ、ラット DRG ニューロンのファイバーの配向に沿った軸索の伸長が認められた。一昨年度の P C 12 細胞を用いた評価と比較して、軸索の伸長が大きく促進され、かつその方向を制御する

ことができた。末梢神経再生のための足場として使用する場合、神経断面間の長軸方向への軸索伸長が速い神経再生に重要であり、本研究の配向型 IK-VP とポリ L-乳酸の混合マイクロファイバーがそれを実現できる可能性が示唆される。

E. 結論

本年度は、昨年度に得たエラスチン様繰り返し骨格配列((VPGIG)₆₀; VP)へのラミニン由来神経再生性 IKVAV 配列の導入とその大量発現系の確立、さらにそれら人工タンパク質とポリ L-乳酸の配向型混合マイクロファイバーの作製とラット DRG ニューロンの接着および軸索伸長の *in vitro* 評価を行った。

VP および、それに IKVAV 配列が導入された IK-VP 共に、 100 mg / 1 L 培養を超す大量発現系を確立することができた。そのため、足場材料に用いるための充分量を確保できると考え、VP および IK-VP のみでのマイクロファイバー化を検討した。いずれも電界紡糸によってマイクロファイバー化することができたものの、PBS に浸漬した際に安定性が乏しかった。神経誘導管として使用する際は、神経再生が完了する数か月間はファイバーの形状が保持されねばならず、タンパク質のみでなるマイクロファイバーはその用途に適さないと判断した。そこで、一昨年度からの試みと同じく、ポリ L-乳酸との混合化によって安定性の向上を計ったところ、VP および

IK-VP いずれを混合したポリ L-乳酸マイクロファイバーも、PBS に 24 時間浸漬させた際は形状を維持していた。続くラット DRG ニューロンを用いた *in vitro* 評価では、生理的環境下で 72 時間晒された際もファイバーの形状が維持されていることも確認した。また、IK-VP とポリ L-乳酸を混合したマイクロファイバー上でのみ、ラット DRG ニューロンはニューロフィラメント陽性の長い軸索をファイバーの配向に沿って伸長した。その軸索の長さは、一昨年度に PC12 細胞で見られた 10 μ m 程度のものとは違い、長いもので 50 μ m にも達していた。細胞種や培養期間が異なるため直接比較することができないものの、5 倍もの軸索長の違いは大きな活性の向上と期待される。

研究開始当初は、エラスチン繰り返し骨格配列を持つ人工タンパク質の温度凝集性を利用した細胞移植担体（移植細胞の活性・保護剤）としての利用も検討する計画であった。しかし、平成 24 - 25 年度に、我々が既存していた人工タンパク質の *in vivo* における末梢神経再生促進能力が乏しいことが明らかとなつたため、新たな人工タンパク質の生合成に舵を振つて研究を遂行した。本年度に得た IK-VP の水溶液に 4 度 PC12 細胞を分散させた後、37 度 IK-VP を凝集させることで、細胞も同時に凝集されることを確認している（図？）。移植細胞を IK-VP の温度凝集性を利用して保護できる可能性に期待されるもの

の、移植用担体（補助材）としての有用性の検証には至らなかつたことは、研究計画の不充分さを反省すべき点である。しかし、エラスチン様人工タンパク質を使ったバイオマテリアルの動物実験の報告結果から、エラスチン骨格配列は抗原性が低いことが予測されており、我々は今もなお移植用担体として適切だと考えている。本研究プロジェクトで得た貴重な知見をもととして、引き続き、人工タンパク質（特に、本年度得た IK-VP）の神経再生性について評価したい。

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

1) Sachiro Kakinoki, Tetsuji Yamaoka, Thermoresponsive elastin/laminin mimicking artificial protein for modifying PLLA scaffolds in nerve regeneration, *J. Mat.*

Chem. B, 2, 5061-5067 (2014).

2) Sachiro Kakinoki, Midori Nakayama, Toshiyuki Moritan, Tetsuji Yamaoka, Three-layer microfibrous peripheral nerve guide conduit composed of elastin-laminin mimetic artificial protein and poly(L-lactic acid), *Frontiers in Chemistry*, 2, Article 52 (2014).

2. 総説・著書等

該当なし

3. 学会発表

1) 柿木佐知朗、中山みどり、森反俊幸、山岡哲二、ECM 模倣マトリクスとポリ乳酸との複合ナノファイバーを用いた末梢神経再生、平成 26 年度纖維学会年次大会（2014 年 6 月 11 - 13 日、船堀）[国内学会、口頭発表]

2) 柿木佐知朗、中山みどり、森反俊幸、山岡哲二、エラスチン ラミニン模倣人工タンパク質/ポリ乳酸マイクロファイバーによる神経誘導チューブによる末梢神経再生、第 52 回日本人工臓器学会大会（2014 年 10 月 17 - 19 日、札幌）[国内学会、口頭発表]

3) Sachiro Kakinoki, Midori Nakayama, Toshiyuki Moritan, Tetsuji Yamaoka, Electrospun Micro-Fibrous Conduits Composed of Poly(l-lactic Acid) and Elastin-Laminin Mimicking Protein for Peripheral Nerve Regeneration, 2014 TERMIS-AM Conference (December 13-16, 2014, Washington D.C., USA) [国際学会、口頭発表]

4) 柿木佐知朗、中山みどり、森反俊幸、山岡哲二、エラスチン・ラミニン模倣人工細胞外マトリクス混合ポリ乳酸ファイバーによる神経再生用スキャホールドの開発、日本化学会第95回春季年会（2015年3月29日、日大船橋 [国内学会、口頭発表]

H . 知的財産権の出願・登録情報

該当なし

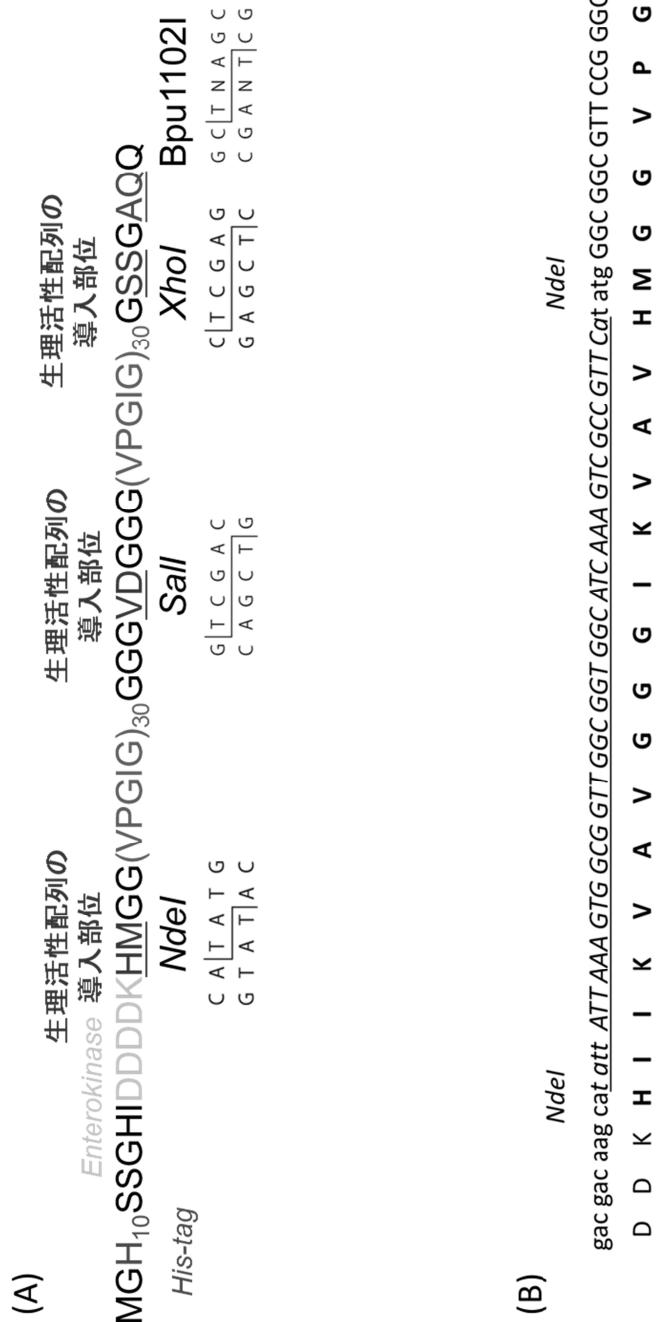


図1.(A) (VPGIG)60のアミノ酸配列と生理活性配列を導入できる部位
 (B) ラミニン由来IKAVA配列をコードしたDNAの塩基とアミノ酸配列

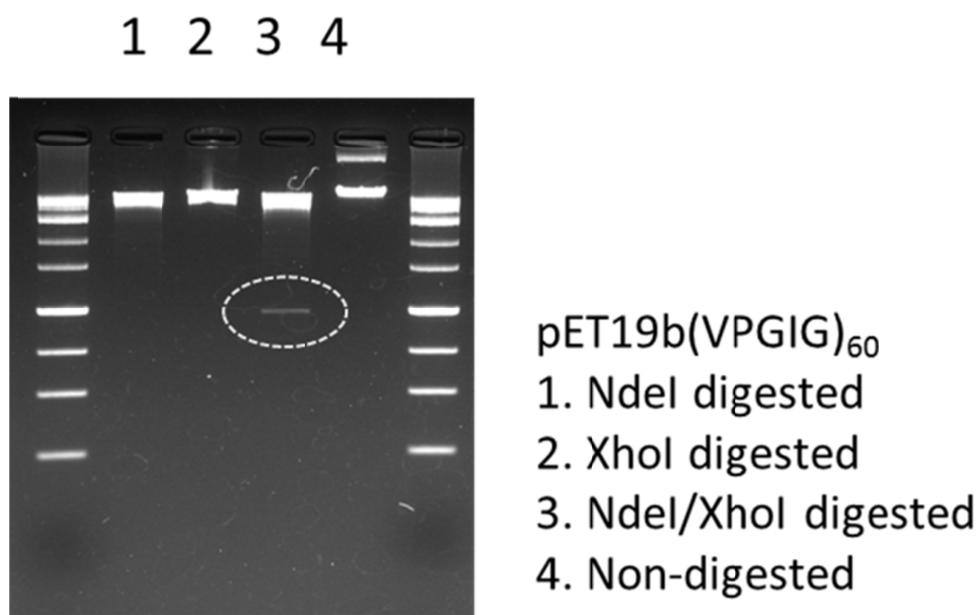


図2 . pET19b(VPGIG)₆₀ の NdeI および XhoI 制限酵素切断サイトの確認

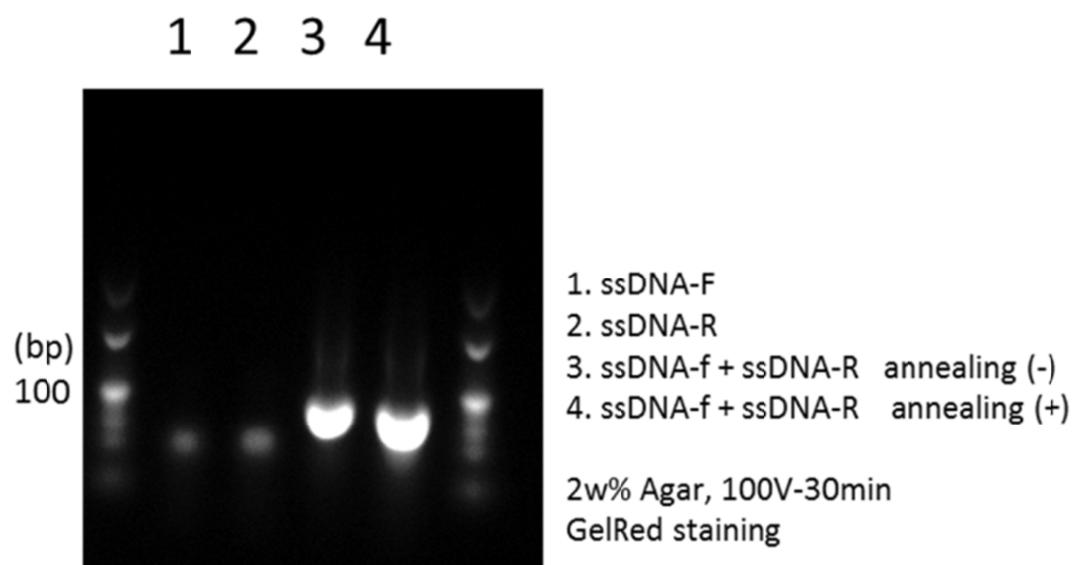


図3 . IKVAV をコードしたインサート DNA の二重鎖形成
(アニーリングの有無を比較)

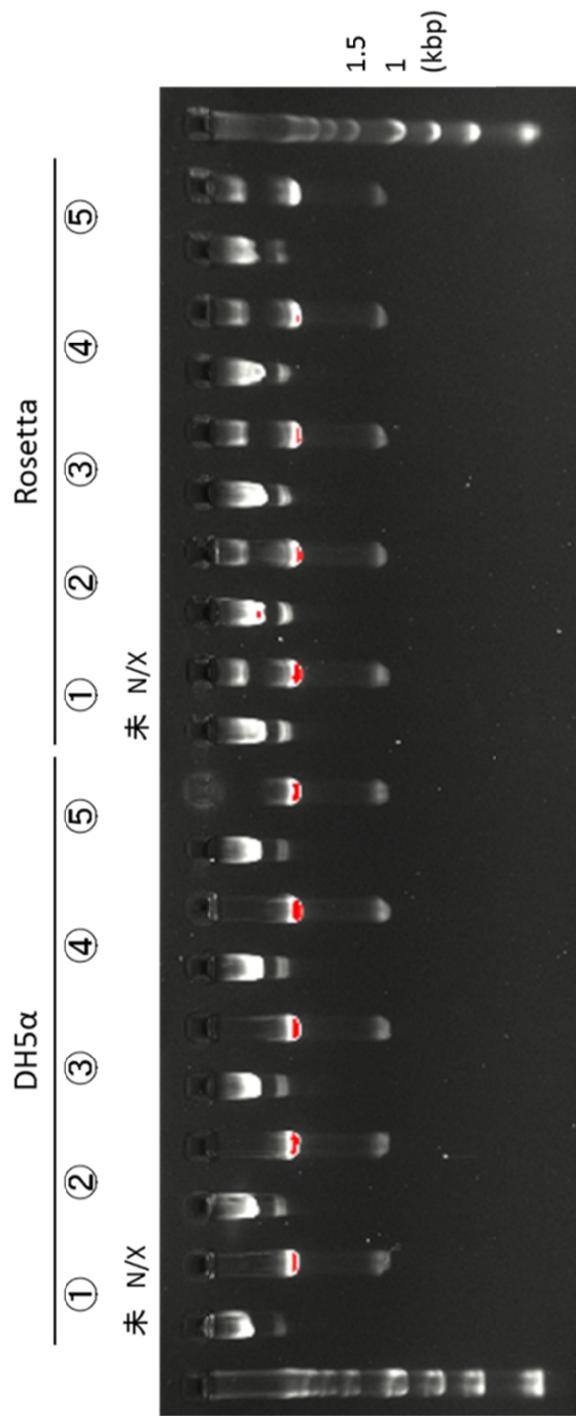


図4 . pET19b(IKVAV-(VPGIG)₆₀)で形質転換した DH 5 コンピテントセルおよび Rosetta コンピテントセル (コロニー1~5) から回収したプラスミドの NdeI/XhoI 消化後のアガロースゲル電気泳動
[左: 未切断プラスミド, d: NdeI/XhoI 消化後]

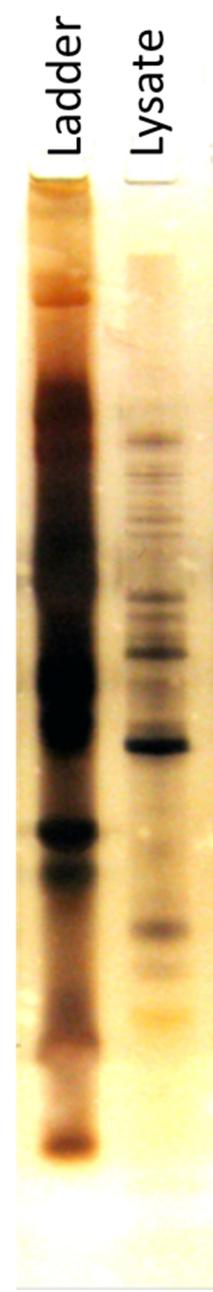


図 5 . 発現誘導後の pET19b(IKVAV-(VPGIG)₆₀)で形質転換した Rosetta 株破
菌溶液の SDS-PAGE

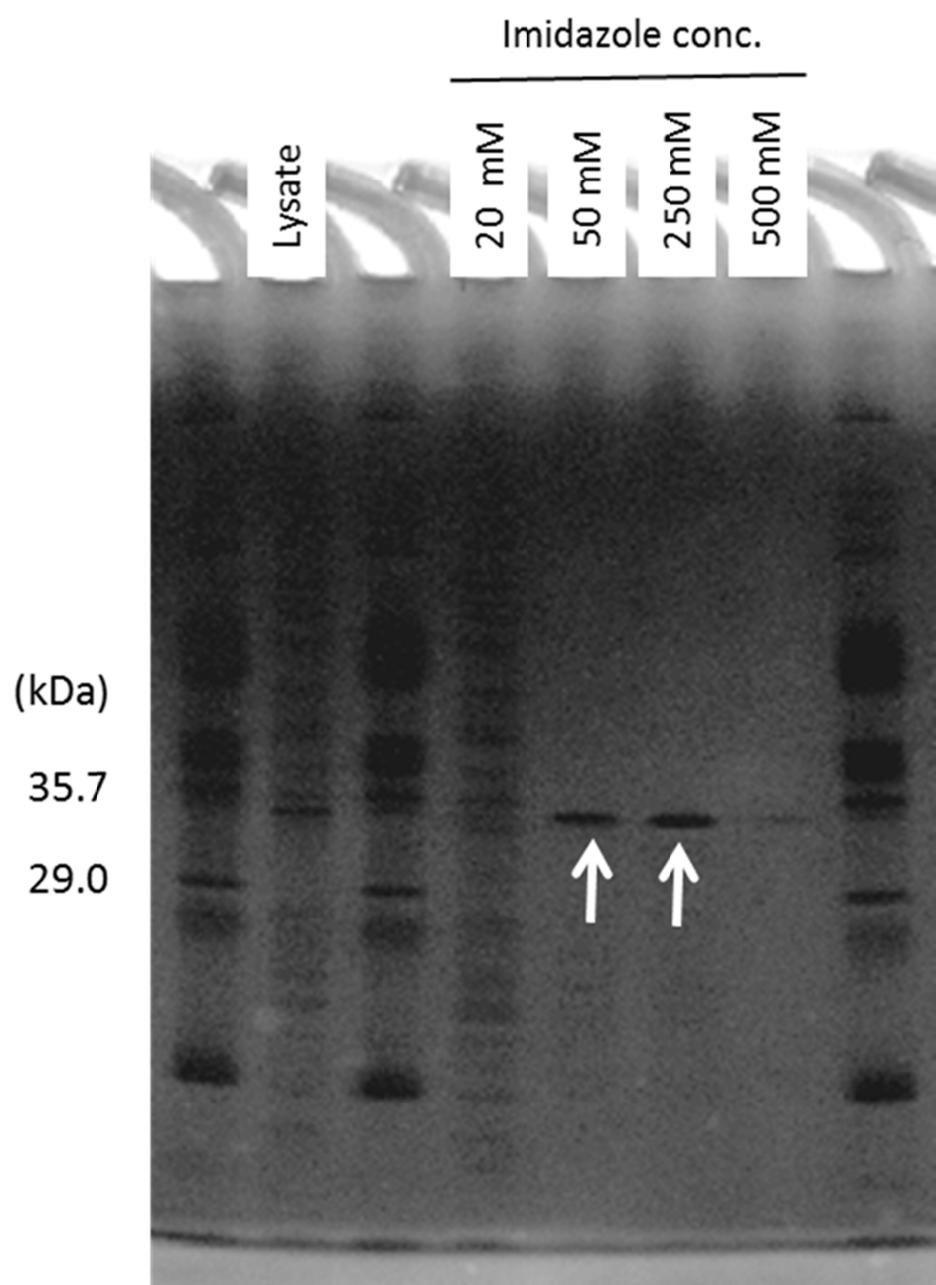


図6. 生合成したIK-VPのHisキレートカラムでの各精製段階におけるSDS-PAGE
 [吸着後に20, 50, 250および500 mMのイミダゾールを含む緩衝液で溶出させた溶離液]

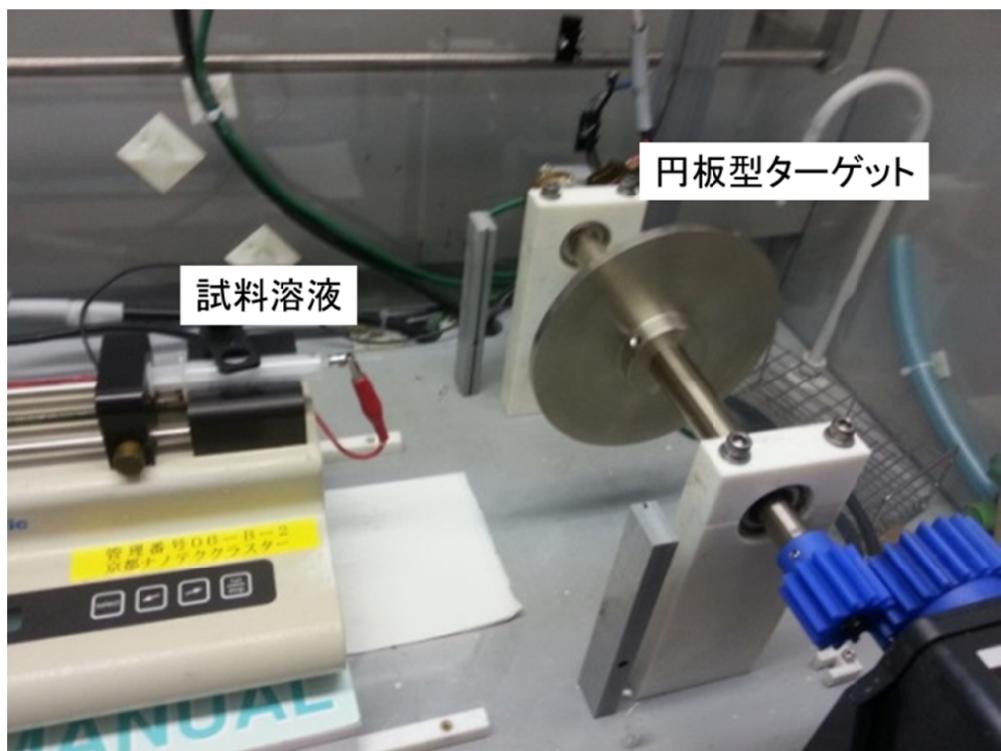


図 7. 円板型ターゲットを用いた電界紡糸装置

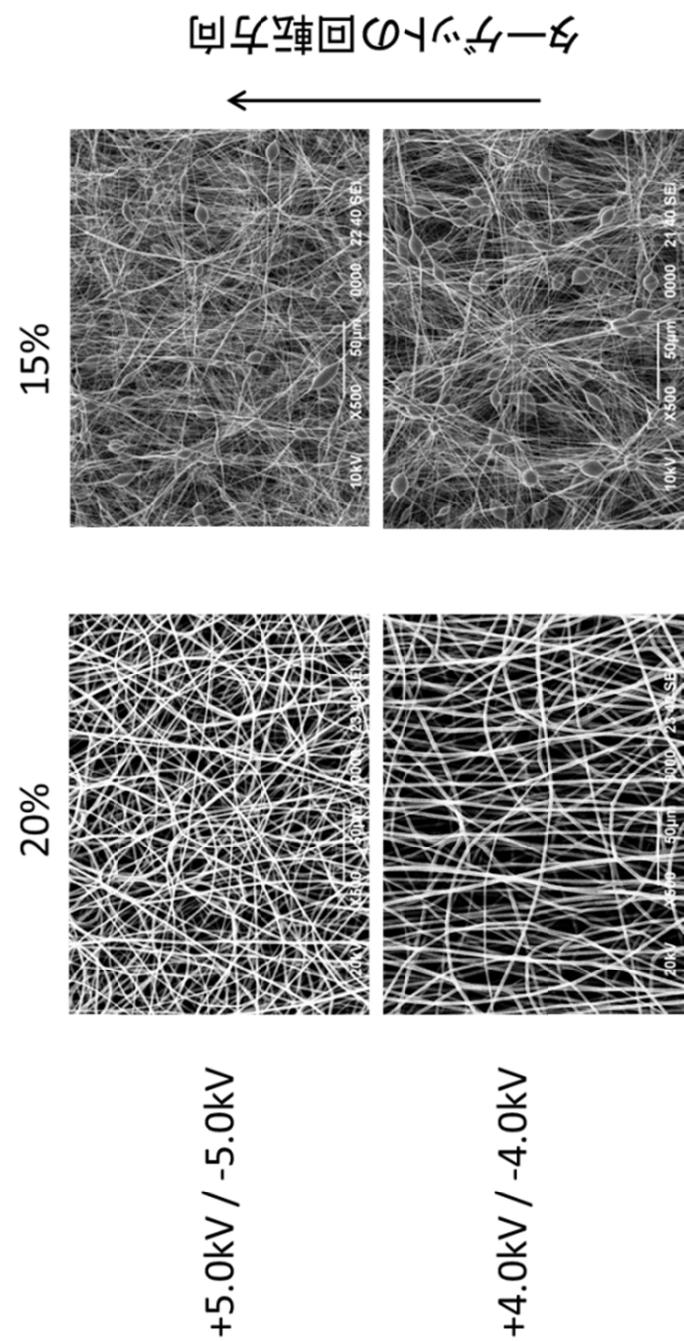


図 8 . 円板型ターゲットへ電界紡糸したポリ L- 乳酸ファイバーの形態
[走査型電子顕微鏡による観察]

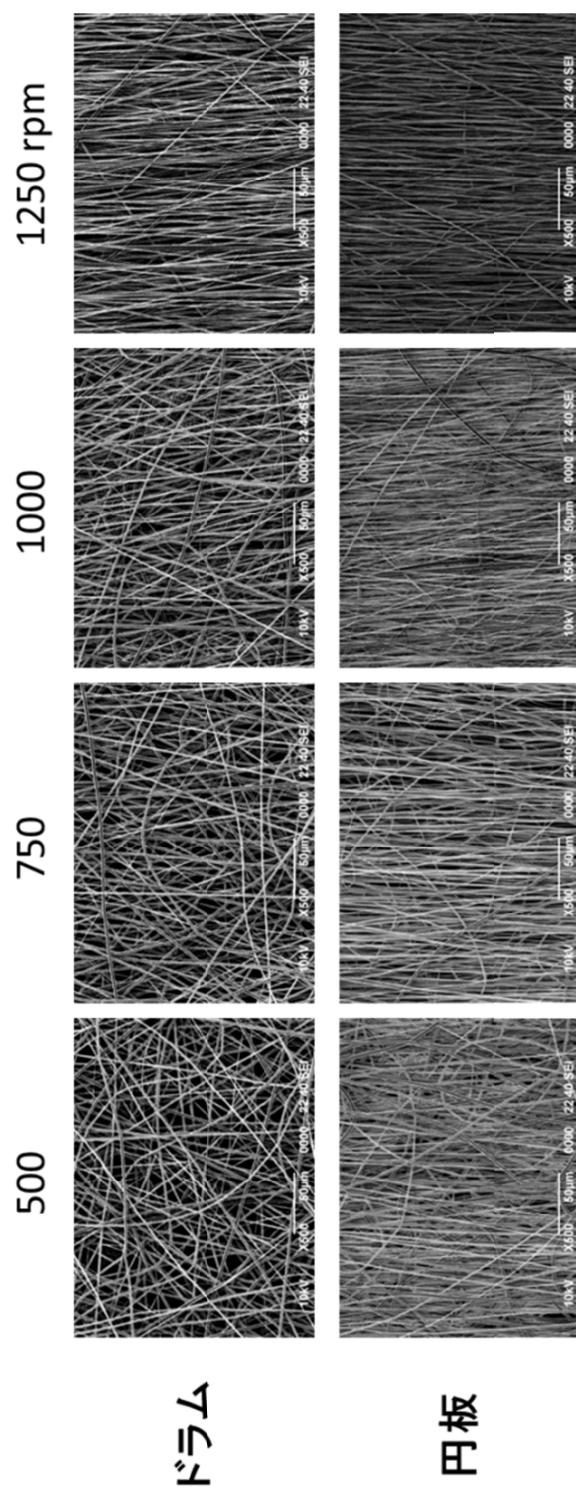
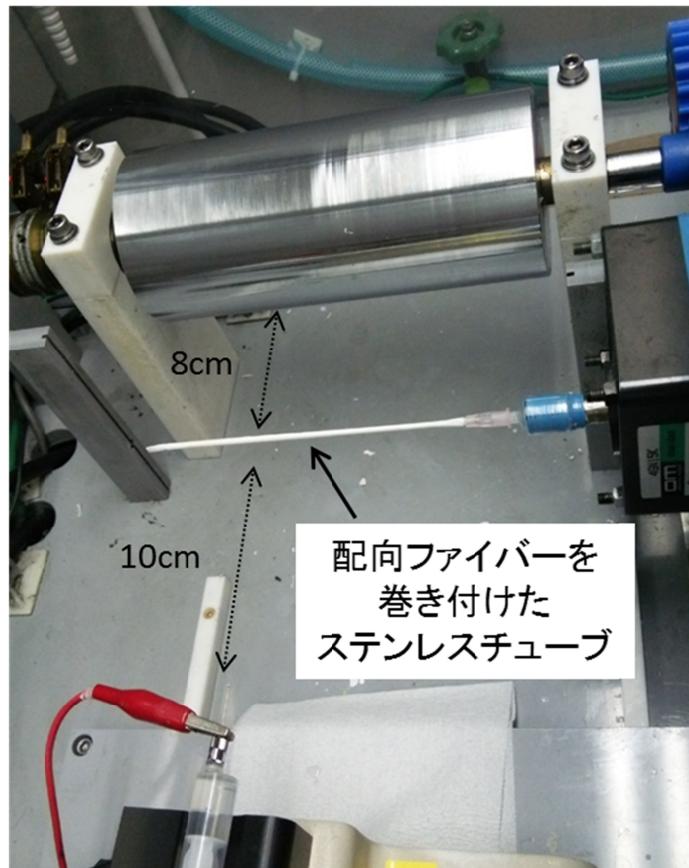


図9. ポリL-乳酸マイクロファイバーの配向化条件の検討
ドラム型および円板型ターゲットの比較

(A)



(B)



図10. 配向性ポリL-乳酸マイクロファイバーを内層にもつチューブの試作

(A) チューブ作製に用いた装置

(B) 試作したチューブ

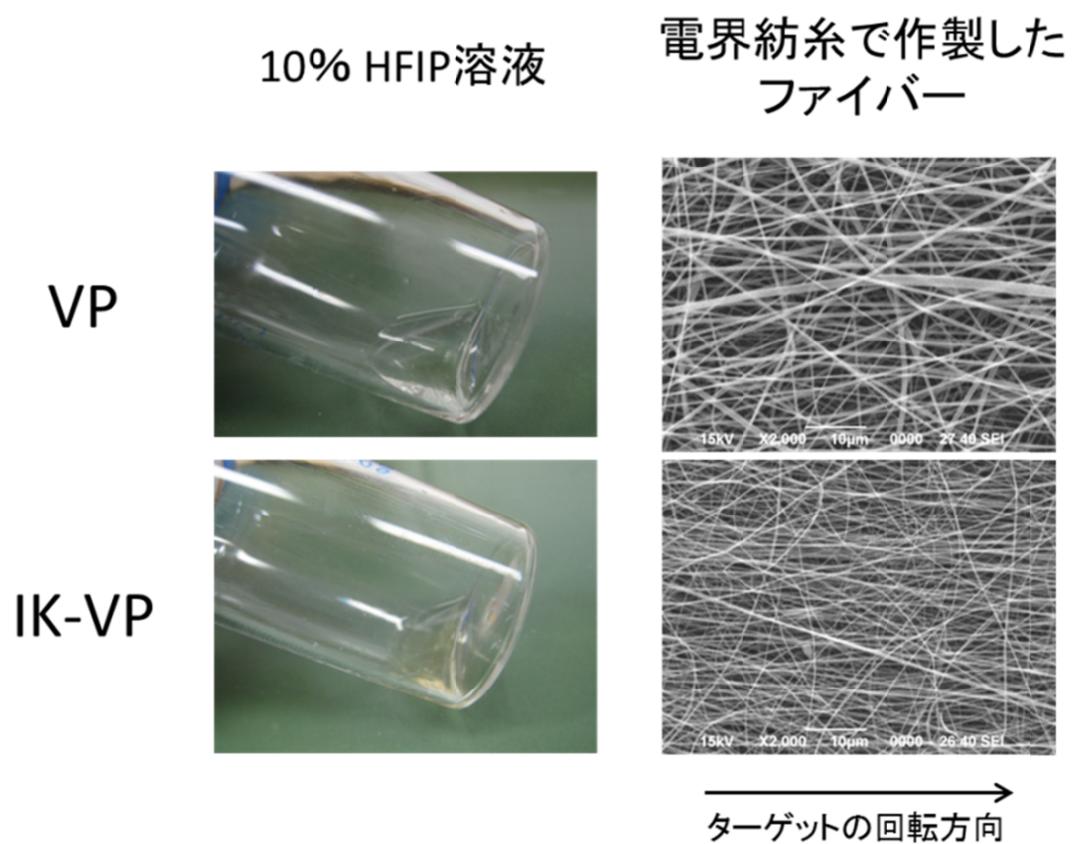


図11. VPおよびIK-VPのみでなるマイクロファイバーの電解紡糸

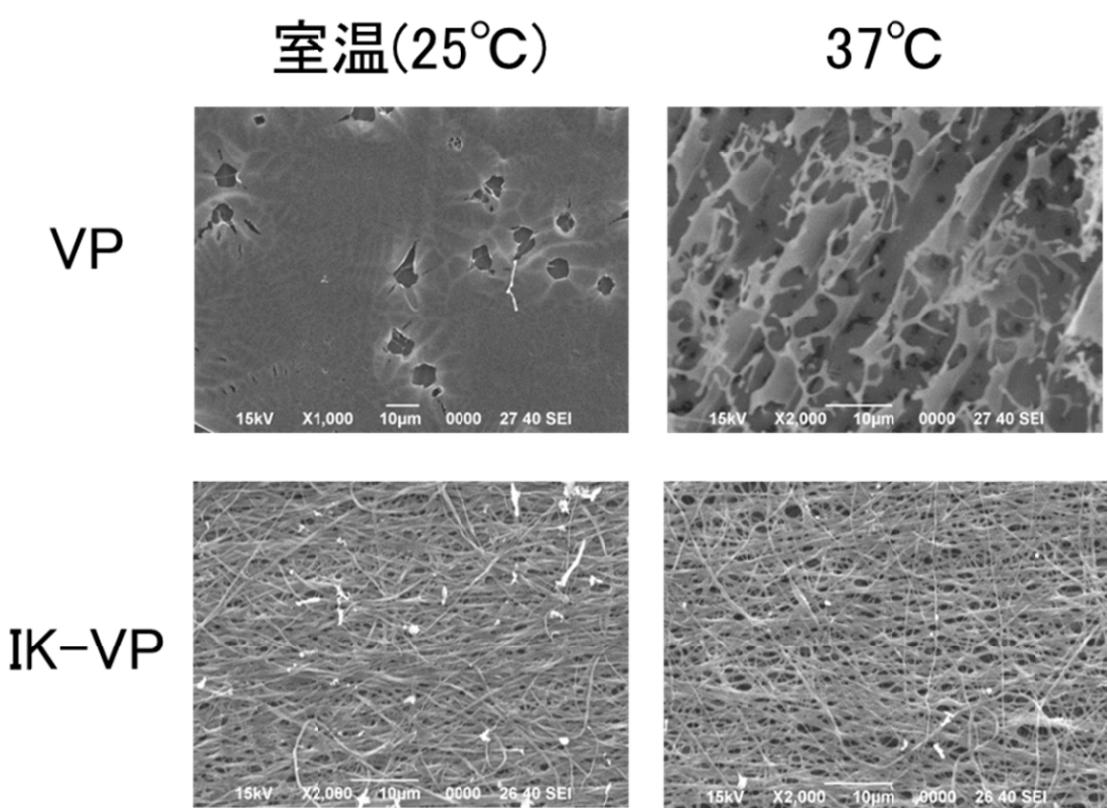


図12. VPおよびIK-VPマイクロファイバーの
PBS中3時間浸漬時の形態変化

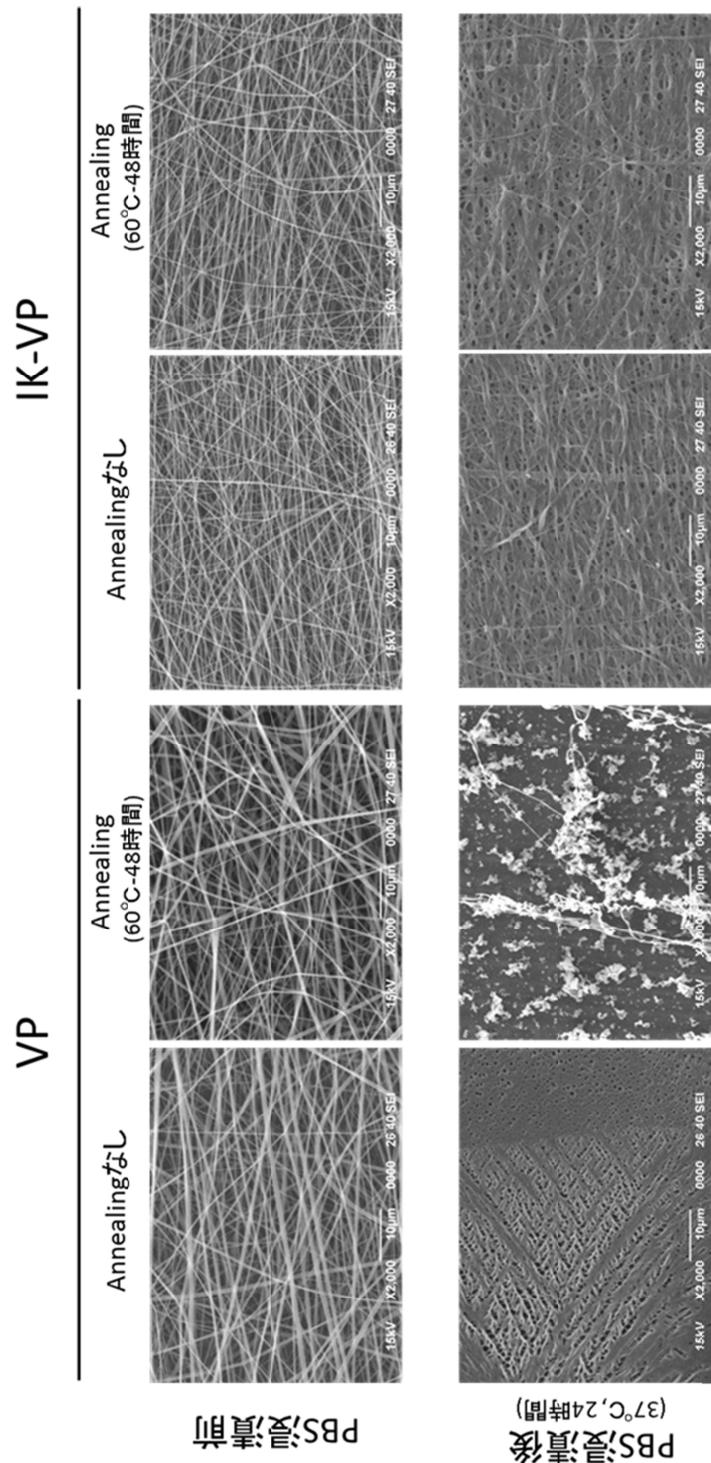


図13. VPおよびIK-VPマイクロファイバーの安定性に対する
アニーリングの効果の検証

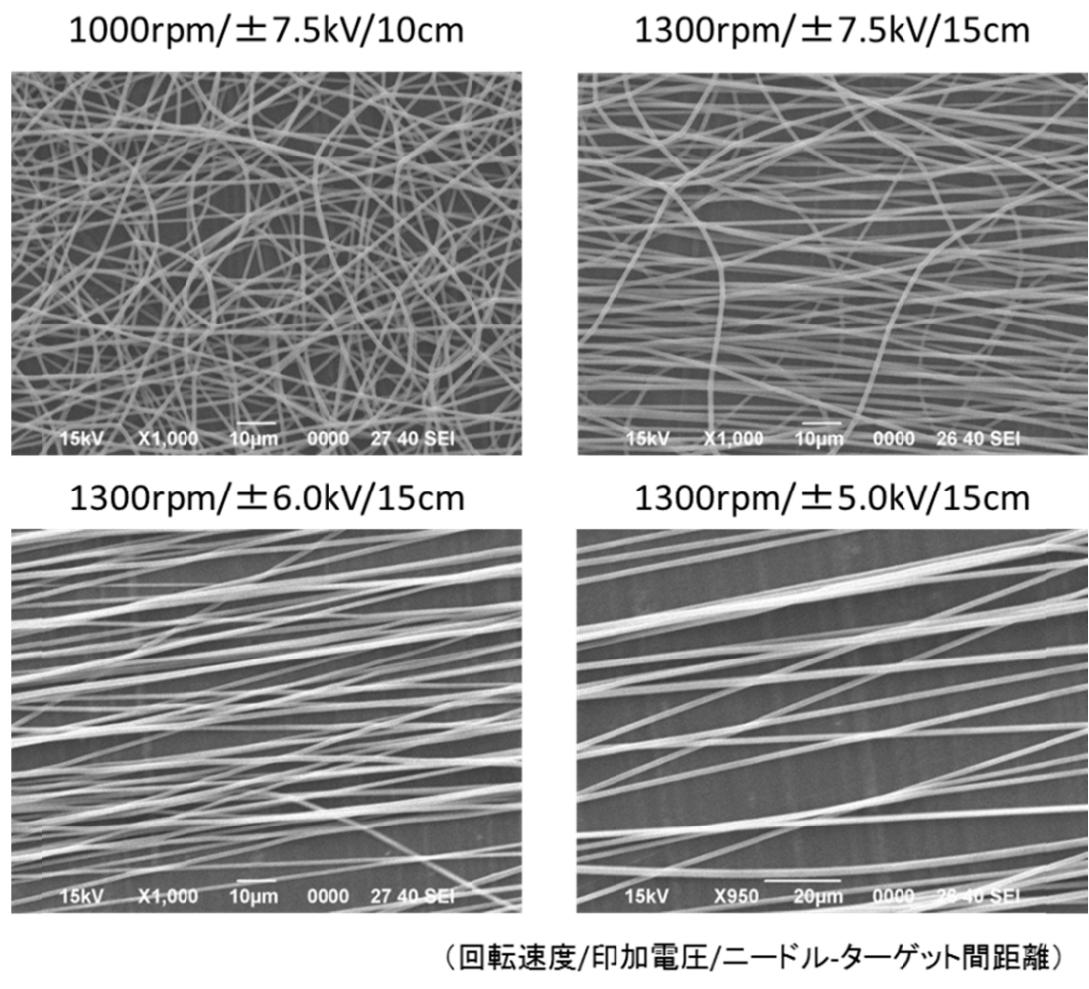
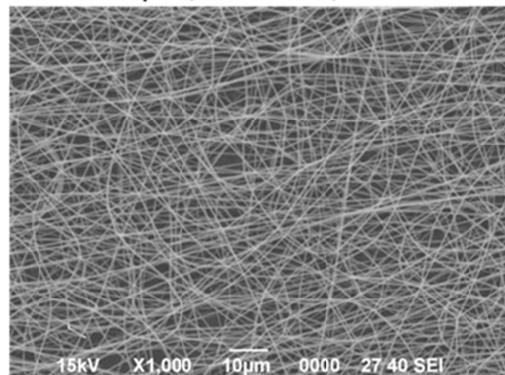
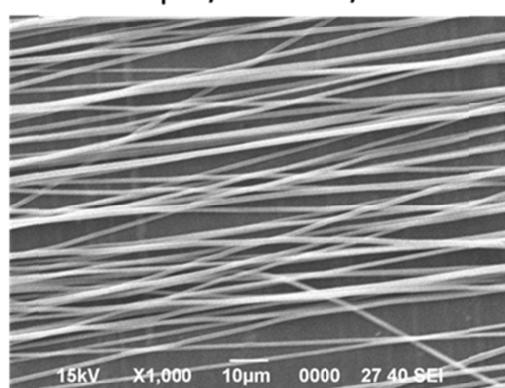


図14. VPとポリL-乳酸混合マイクロファイバーの作製と
配向化条件の検討

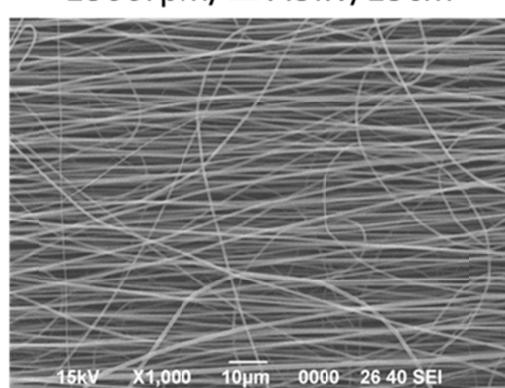
1000rpm/±7.5kV/10cm



1300rpm/±6.0kV/15cm



1300rpm/±7.5kV/15cm



(回転速度/印加電圧/ニードル-ターゲット間距離)

図15. IK-VPとポリL-乳酸混合マイクロファイバーの作製と
配向化条件の検討

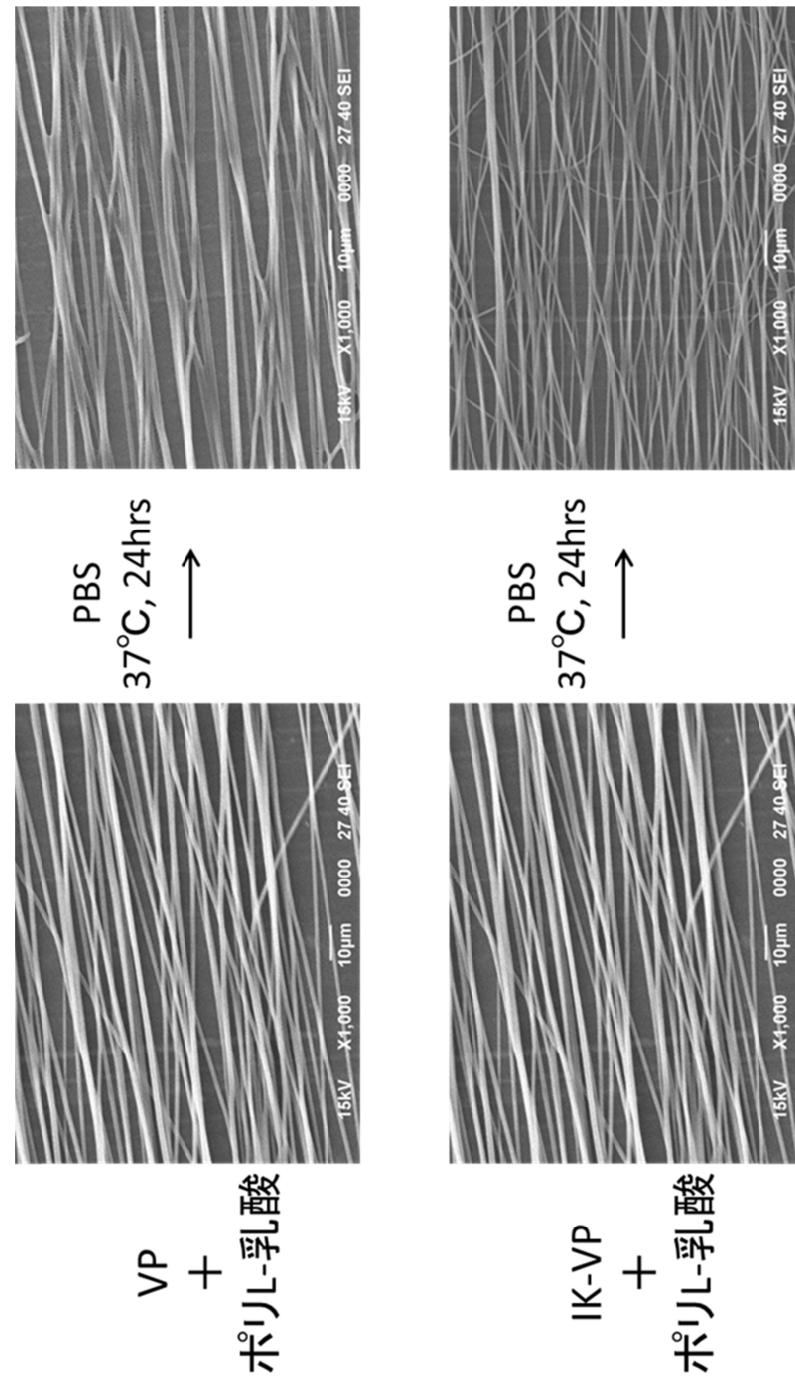
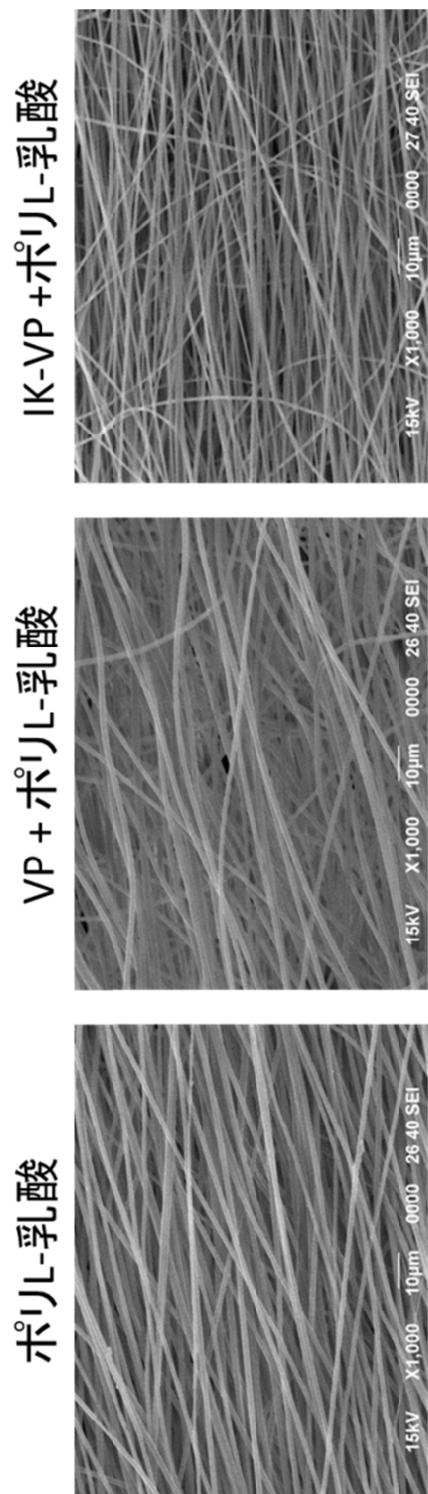


図16. VPもしくはIK-VPとポリL-乳酸との混合マイクロファイバーのPBS中の安定性評価



Cell Culture Slideに挿み込んだ各マイクロファイバー



図17. ポリL-乳酸および、VPもしくはIK-VPとポリL-乳酸との混合マイクロファイバーとそのCell Culture Slideへの固定
(In vitro実験用)

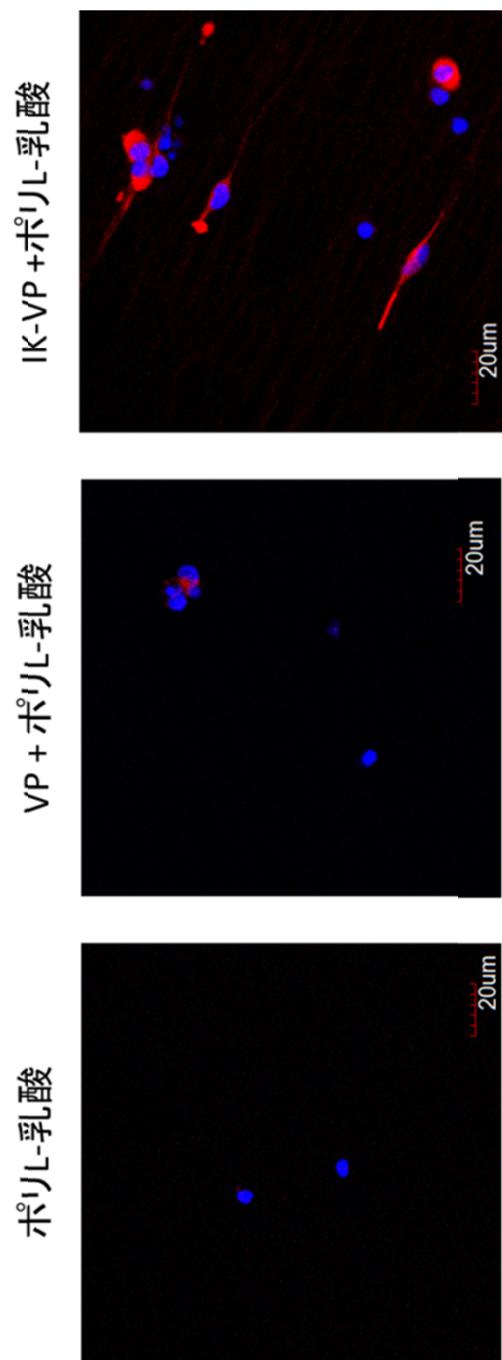


図18. ポリL-乳酸および、VPもしくはIK-VPとポリL-乳酸との混合マイクロファイバー上でのラットDRGニューロンの軸索伸長性挙動
(赤; Neurofilament、青; DAPI)

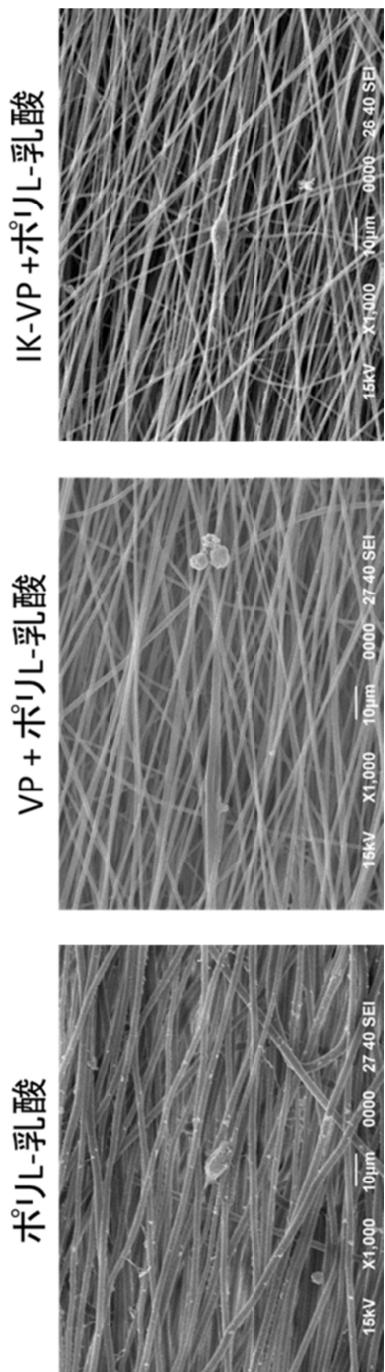


図19. ポリL-乳酸および、VPもしくはIK-VPとポリL-乳酸との混合マイクロファイバー上のラットDRGニューロンの軸索伸長性挙動
(走査型電子顕微鏡による観察)