

201317107A

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 柿木 佐知朗

平成26（2014）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 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 柿木 佐知朗

平成 26 (2014) 年 5 月

別添 2

目 次

I. 総括研究報告書（別添 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

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.....	8
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（別添 4）	21
III. 研究成果の刊行物の別刷り	22

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)_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、細胞の懸濁液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。

初年度（平成24年度）は、既に保有していた発現用大腸菌クローンをを用いて人工細胞外マトリクスの大量発現条件を検討し、得られた人工細胞外マトリクスとポリ乳酸との混合ナノファイバーの作製と *in vitro* での機能評価を行った。さらに、人工タンパク質とポリ乳酸との混合ナノファイバーよりなる神経誘導管の作製（内径2 mm）とウサギ脛骨神経欠損モデルへの移植実験も行った。その結果、エレクトロスピンング法で均一かつ安定にポリ乳酸ファイバー中に人工タンパク質を混合することができ、*in vitro* において PC12 細胞の神経突起伸長効果が認められた。しかし、ウサギ脛骨神経への移植実験では、埋入二ヶ月後の電気生理学的評価において神経再生促進効果はごく僅かなものであった。また、埋入二ヶ月後の外観観察からも、縫合部で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。

そこで本年度（平成25年度）は、人工タンパク質-ポリ乳酸混合ナノファイバー（内径3 mm）神経誘導管をウサギ脛骨神経欠損部に移植し、昨年度よりも長期（三カ月後）の神経再生について電気生理学的に評価した。並行して、より生理活性の高い人工タンパク質を生合成するために、エラスチン骨格を有するタンパク質をコードした遺伝子の設計および合成、大腸菌の形質転換とタンパク質の生合成に

ついて検討した。

B. 研究方法

1. 神経再生性人工細胞外マトリクス (VP-AG) の生合成

昨年度と同様、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-GRRL-(VPGIG)₃₀-VPLE ; VP-AG) は、大腸菌発現系を用いて生合成した。VP-AG の発現株は、既に研究代表者のグループで作製されていたものを用いた。フローズンストックから 2 x Y T 培地で VP-AG 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 VP-AG 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 VP-AG 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、VP-AG を溶出させた。どの溶出液に VP-AG が含まれているかは、銀染色による SDS-PAGE で確認した。VP-AG 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 VP-AG を得た。

2. 神経再生性人工細胞外マトリクス (VP-AG) -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 VP-AG-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 3.0 mm) をターゲットとし、VP-AG とポリ L-乳酸を混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 k Da) と VP-AG 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 1

5 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 k Da) とポリエチレングリコール (Mw: 20 k Da) 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。

3. 神経再生性人工細胞外マトリクス (VP-AG) -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 VP-AG-ポリ L-乳酸複合ナノファイバーチューブ (内径: 3 mm, 長さ 2 cm) 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3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。

4. 新規人工細胞外マトリクス生合成のための骨格DNAの設計

エラスチン繰り返し配列 (V P G I G 配列の30回繰り返し) を制限酵素認識配列によって連結されたタンパク質配列を設計した。それをコードした DNA 配列は、大腸菌の使用頻度の高いコドンを用いて最適化した。まず、クローニングベクター (pUC57) のマルチクローニングサイトに存在する EcoRI と HindIII サイドに上述の DNA 配列を挿入した。この pUC57((VPGIG₃₀)₂) をコンピテントセル (DH5 α , TAKARA) にヒートショック法で導入し、LB 培地寒天プレート (アンピシリン含有) 上でコロニーを得て、クローニング用株とした。続いて、pUC57((VPGIG₃₀)₂) を制限酵素 NdeI および Bpu1102I で切断処理して切り出したタンパク質をコードする DNA 配列を、発現用ベクターである pET19b の NdeI-Bpu1102I サイドにサブクローニングした。得られた pET19b((VPGIG₃₀)₂) をタンパク質発現用のコンピテントセル (RosettaTM, Novagen) にヒートショック法で導入し、LB 培地寒天プレート (アンピシリン・クロラムフェニコール含有) 上でコロニーを得て、発現用株を作製した。

5. 新規人工細胞外マトリクス

((VPGIG₃₀)₂)の大腸菌による生合成

pET19b((VPGIG₃₀)₂)で形質転換された大腸菌 (Rosetta) を 5 mL 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°Cで 24 時間培養、タンパク質(VPGIG₃₀)₂ を発現誘導した。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 μ m 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 (VPGIG₃₀)₂ 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、50 mM のイミダゾールを含むリン酸緩衝溶液で順次、(VPGIG₃₀)₂ を溶出させた。溶出した水溶液を SDS-PAGE で泳動し、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°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

によって高純度の(VPGIG₃₀)₂を得た。

C. 研究結果

1. 神経再生性人工細胞外マトリクス (VP-AG) の生合成

VP-AG 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を用いて精製した。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 VP-AG を得た。

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

内層がポリ L-乳酸 (Mw: 10 kDa) のみ、ポリ L-乳酸と AG73 ペプチドもしくは VP-AG とを質量比 4 : 1 で混合してナノファイバーよりなるチューブの外観、断面、内層および外層の走査型電子顕微鏡観察像を図 1 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。内層のファイバーの直径は、ポリ L-乳酸のみで約 2.0 μm、AG73 ペプチドを混合したもので約 1.5 μm、VP-AG を混合したものでは約 0.8 μm であった。外層の PEG 混合ファイバーは、いずれのチューブにおいても直径が約 2.0 μm であった。

3. 神経再生性人工細胞外マトリクス (VP-AG) -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 cm に裁断し、ウサギの脛骨神経に作製した 2.0 cm の欠損部位に移植した。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 3 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(図 2)。一方、ナノファイバーチューブを移植した各群では、内層がポリ L-乳酸の一羽を除いて周辺組織の癒着はほとんど認められず、容易に露出させることができた。その際、内径 2 mm のチューブを移植した前年度と比較して、今回は縫合部での神経様組織の外部増殖は見られなかった。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 3、表 1)。その結果、内層がポリ L-乳酸のチューブでは、活動電位のピークの平均時間は 0.17 msec、平均強度は 0.35 mV であった。また、ポリ L-乳酸/AG73 ペプチド混合ファイバーが内層のチューブでは、活動電位のピークの平均時間は 0.15 msec、平均強度は 0.33 mV であった。それらと比較して、ポリ L-乳酸/VP-AG 混合ファイバーが内層のチューブでは、ピークの平均時間は 0.15 msec、平均強度は 0.42 mV となり、活動電位の強度が他の二群の約 1.5 倍であった。

4. 新規人工細胞外マトリクス生合成のための骨格 DNA の設計

まず、2つのエラスチン繰り返し配列ブロック（V P G I G配列の30回繰り返し）を制限酵素認識配列によって連結したタンパク質の配列を設計した（図4）。pUC57のマルチクローニングサイトに存在する EcoRI と HindIII サイドに上述のDNA配列を挿入（pUC57((VPGIG₃₀)₂）し、それを導入したDH5αのクローンを得た。回収した5コロニーから QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社製)でプラスミドを抽出し、NdeI/XhoIで消化してフラグメントの長さをアガロースゲル電気泳動で確認したところ、317、937および2487bp付近にバンドが確認され、理論値と一致した（図5）。シーケンス解析の結果、設計したDNA配列が pUC57に導入されていることを確認した（図6）。さらに、pUC57((VPGIG₃₀)₂）を制限酵素 NdeI および Bpu1102I で切断処理して切り出したタンパク質をコードする DNA 配列を、発現用ベクターである pET19b の NdeI-Bpu1102I サイドにサブクローニングした（pET19b((VPGIG₃₀)₂））。pET19b((VPGIG₃₀)₂）で形質転換した Rosetta™ 株から5コロニーを回収した。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社製)でプラスミドを抽出後、NdeI/XhoIで消化してフラグメントの長さをアガロースゲル電気泳動で確認したところ、937および5665bp付近にバンドが確認され、理論値と一致した（図7）。シーケンス解析の結果、設計したDNA配列が

pUC57 に導入されていることを確認した（図8）。

5. 新規人工細胞外マトリクス ((VPGIG₃₀)₂)の大腸菌による生合成

新規人工細胞外マトリクスの骨格タンパク質 ((VPGIG₃₀)₂) を500mLスケールで発現誘導し、碎菌後、ライセートをSDS-PAGEで評価した。その結果、29.6kDaの (VPGIG₃₀)₂ のバンドが確認された（図9）。

D. 考察

昨年度に決定した条件で神経再生性人工細胞外マトリクス (VP-AG) を発現および精製することができた。そして、エレクトロスピニング法によって、内層がポリL乳酸/VP-AG混合ファイバー、中層がポリL乳酸、外層がポリ乳酸/PEG混合ファイバーである、三層構造のチューブ（神経誘導管、内径3mm）を作製できた。

内径を前年度の2mmから3mmに変更したことで、埋入後の神経様組織のチューブ外での増殖を僅かに阻止することができた。これは、チューブを縫合する際、神経組織を確実にチューブ内部へ誘引できたことによるものと考えられる。理想的には、移植する個体に合わせてファイバー径を設定するのが好ましい。VP-AGを混合したポリL-乳酸ナノファイバーを内層とするチューブをウサギ脛骨神経の欠損部へ移植して3ヶ月後に電気生理学的に末梢神経再生を評価し

たところ、活動電位のピーク平均時間は約0.15 mV程度と他のチューブと同様であったが、平均強度が0.42 mVとなり、他のチューブの約1.5倍であった。健常な脛骨神経では、活動電位のピークの平均時間は0.14 msec、平均強度は0.86 mVであることから、いずれのチューブ内でも有髄神経が中枢・末梢間で形成されており、それはポリL乳酸/VP-AG混合ファイバーが内層のチューブにおいて最も成熟していることが示唆された。しかしながら、再生した神経の機能は健常神経には及ばず、既存の神経誘導管（動物由来コラーゲンを神経再生誘導分子として使用）の報告例（2カ月程度）と比較しても再生速度は遅かった。これらの結果から、VP-AGよりも生理活性の高い人工細胞外マトリクスを設計する必要性が示唆された。

そのため、本年度の後半は新たな人工細胞体マトリクスの設計および発現に着手した。その骨格として((VPGIG)₃₀)₂の大腸菌発現系を確立した。具体的には、((VPGIG)₃₀)₂をコードしたDNA配列がマルチクローニングサイトに導入されたクローニングベクターpUC59と発現用ベクターpET19bを作製し、それぞれで形質転換したクローニング用大腸菌株(DH5α)と発現用大腸菌株(Rosetta)を得た。さらに、VP-AGの時と同様の発現条件にて、pET19b((VPGIG)₃₀)₂で形質転換したRosetta株から((VPGIG)₃₀)₂を発現誘導することがで

きた。((VPGIG)₃₀)₂は、VP-AG同様にVPGIG繰り返し配列を有していることから、低温での緩やかな発現誘導が有効と考えられる。また、VPGIG繰り返し配列が長くなることでVP-AGよりも疎水性が強くなり、大腸菌に対する毒性も高くなることが懸念されたが、低温による発現誘導では顕著な毒性は認められていない。現在、初年度に確立したVP-AGの精製条件を参考として、((VPGIG)₃₀)₂の精製条件を検討している。

E. 結論

初年度に引続いて、本年度の前半はVP-AGとポリL乳酸の複合ナノファイバー不織布を内層に有するチューブを作製し、ウサギ脛骨神経欠損(2cm)の再生性を評価した。内径2mmから3mmに変更することで、移植後の神経組織の外部への増殖が僅かに抑制された。ウサギの固体に応じて内径を適宜選択することが最も望ましいと考えられる。また、昨年度の移植2カ月後から、本年度は3カ月後に延長して電気生理学的な評価を行ったところ、VP-AGとポリL乳酸の複合ナノファイバーを内層とするチューブで神経再生、特に有髄神経の成熟促進が認められた。しかし、その再生速度は既に臨床で用いられているコラーゲンを充填したポリ乳酸製チューブと比較すると遥かに遅く、実用化のレベルには到達していない。より高い神経再生性を有する人工タンパク質の設計が必要と考えられた。

そのため、本年度の後半は、新たな人工タンパク質の設計に着手した。まず、その骨格となるエラスチン繰り返し配列のセグメントを持つタンパク質 ((VPGIG₃₀)₂) の生合成系の確立を目指した。そして、(VPGIG₃₀)₂ をコードした DNA の合成、クローニングおよび発現用ベクターの作製、クローニングおよび発現用大腸菌株の作製と (VPGIG₃₀)₂ の発現誘導まで到達した。引続き、精製条件の検討と生理活性配列の導入に取り組む。生理活性配列には、神経成長因子 (NGF) の活性配列である SSSHPIFHRGEFSV と、ラミニン由来の IKVAV、さらに軸索末端で発現しているメタロプロテアーゼであるナルディラジンの認識切断配列を組み合わせたものを考えている。この生理活性配列によって、IKVAV による神経細胞の NGF シグナルの促進と、軸索伸長に伴うナルディラジンの産生に応答した NGF 活性配列の溶出によって軸索伸長がさらに促進されると考えられ、結果として神経の再生も亢進することを期待している。生理活性配列を組み込んだ人工タンパク質を合成でき次第、それのみ、もしくはポリ乳酸と混合したファイバーの作製と、In vitro における PC12 細胞の接着性および突起伸長活性評価、さらにウサギ脛骨神経欠損モデルを用いた神経再生性の評価に着手する。

さらに、最終年度には、本年度着手できなかった人工細胞外マトリクスの細胞移植用担体としての応用について (2013)p35-40.

いても可能性を検証する。具体的には、新たに作製した人工タンパク質の (VPGIG)_n 配列に起因する温度凝集特性を利用してラット神経幹細胞の凝集体が作製できるかどうかを評価する。

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

- 1) Sachiro Kakinoki, Tetsuji Yamaoka, Thermoresponsive elastin/laminin mimicking artificial protein for modifying PLLA scaffolds in nerve regeneration, *J. Mat. Chem. B* (2014) *in press*.

2. 総説・著書等

- 1) 柿木佐知朗、山岡哲二：神経、再生医療における臨床研究と製品開発（技術情報協会編）

- 2) 柿木佐知朗：ペプチド複合型バイオアクティブバイオマテリアル—ポリ乳酸スキャホールドへのペプチド修飾法の開発と末梢神経再生への展開—、PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN（日本ペプチド学会編集）、No.90, p9-13 (2013).

3. 学会発表

- 1) 柿木佐知朗、中山みどり、森反俊幸、山岡哲二、ポリ乳酸と人工タンパク質の複合ナノファイバーよりなる神経誘導管の機能評価、第59回高分子研究発表会（2013年7月12日、神戸[国内学会、口頭発表]
- 2) Sachiro Kakinoki, Midori Nakayama, Toshiyuki Moritan, Tetsuji Yamaoka, Nanofibrous conduit composed of elastin-laminin mimicking artificial protein and poly(L-lactic acid) for peripheral nerve regeneration, A

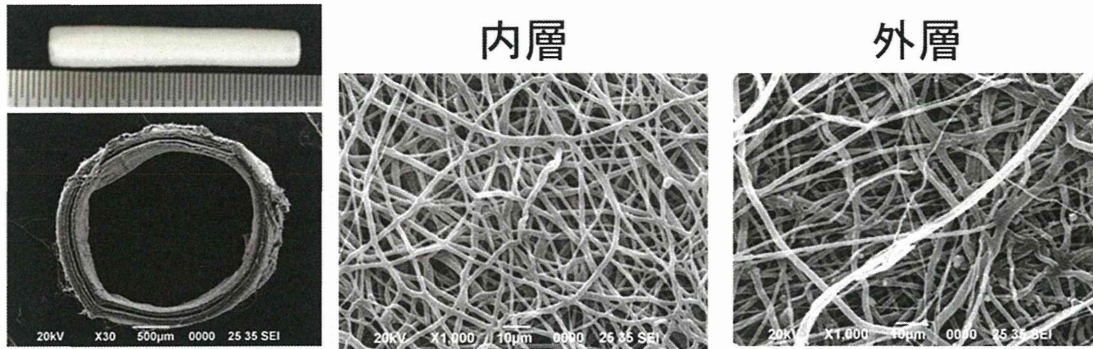
dvanced Materials World Congress (September 16-19, 2013, Izumir, Turkey) [国際学会、ポスター発表]

- 3) 柿木佐知朗、中山みどり、森反俊幸、山岡哲二、人工細胞外基質よりなる神経誘導管を用いた末梢神経再生、第51回日本人工臓器学会大会 / 第5回国際人工臓器学術大会（2013年9月27-29日、横浜）[国内学会、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-ラミニン人工タンパク質を複合したポリ乳酸ナノファイバーの作製と神経再生誘導管への応用、第35回日本バイオマテリアル学会大会（2013年11月25-26日、船堀）[国内学会、口頭発表]

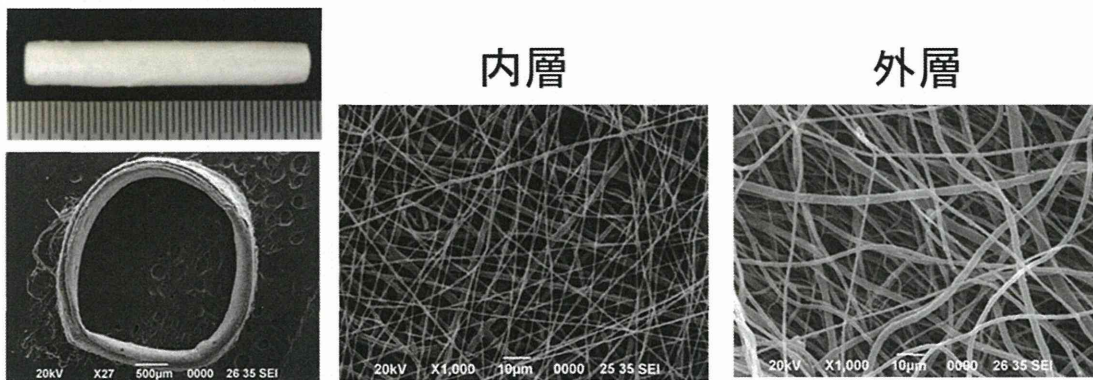
H. 知的財産権の出願・登録情報

該当なし

ポリ乳酸



AG73ペプチド/ポリ乳酸



VP-AG/ポリ乳酸

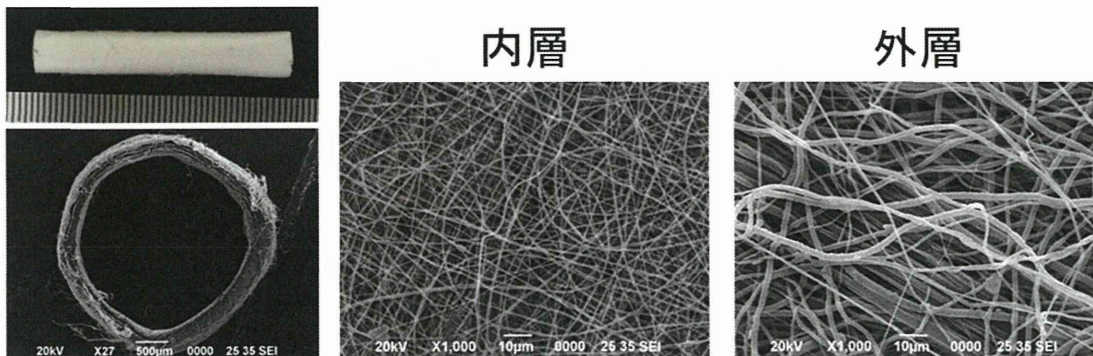
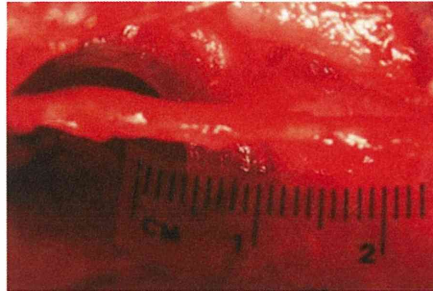
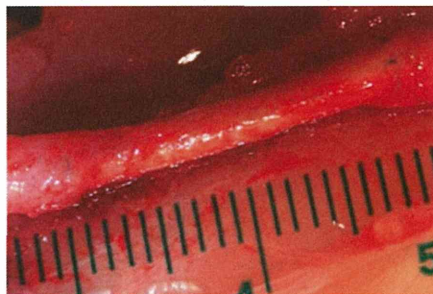


図 1. 各ナノファイバークューブの外観と電子顕微鏡像

自家神経



ポリ乳酸



AG73ペプチド / ポリ乳酸



VP-AG / ポリ乳酸

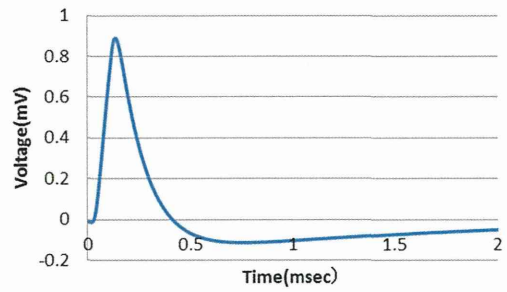


Proximal

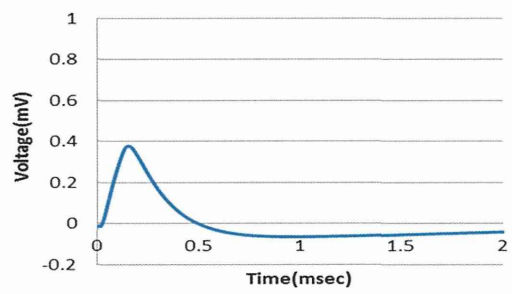
Distal

図2. 移植3カ月後に露出させた各ナノファイバークューブ

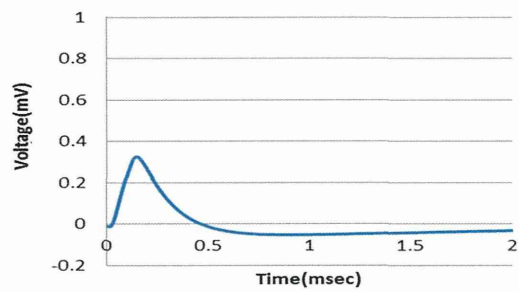
健常な脛骨神経



ポリ乳酸



AG73ペプチド/ポリ乳酸



VP-AG / ポリ乳酸

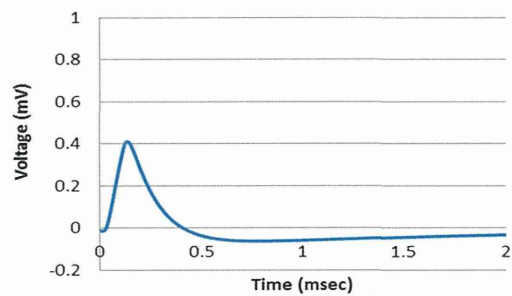
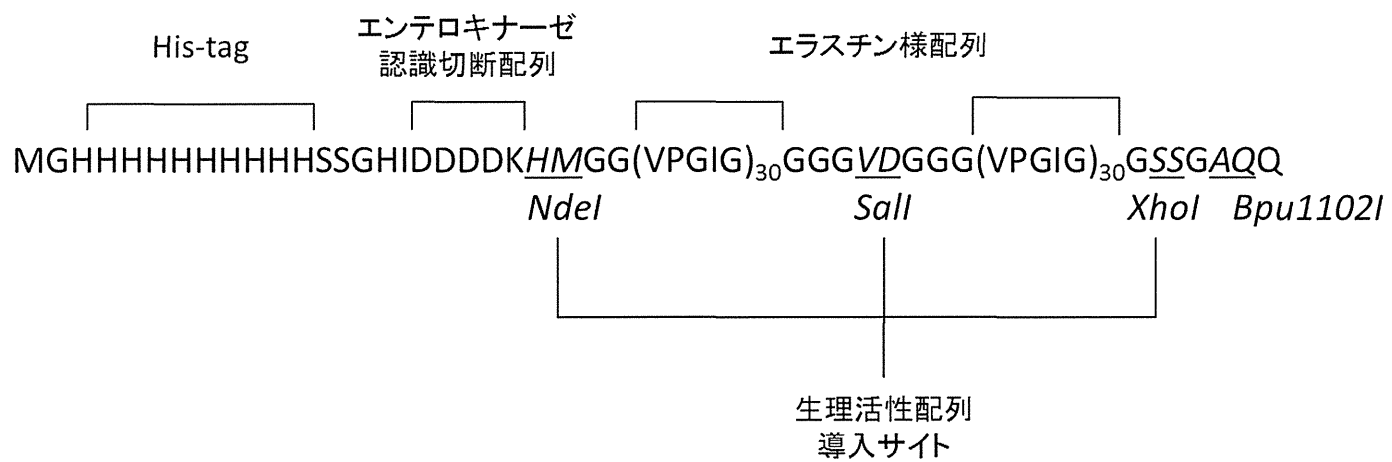


図3. 健常な脛骨神経および各チューブ移植部の近遠間の活動電位

表 1. 各チューブを移植して3カ月後の移植部活動電位のピーク時間と強度

移植群		1	2	3	Average	SD
自家神経	Peak (ms)	0.15	0.15	×	0.15	0
	Intensity (mV)	0.54	0.80	×	0.67	0.18
ポリ乳酸	Peak (ms)	0.15	0.18	×	0.17	0.02
	Intensity (mV)	0.34	0.36	×	0.35	0.01
AG73/ポリ乳酸	Peak (ms)	0.15	0.15	0.16	0.15	0.01
	Intensity (mV)	0.41	0.31	0.28	0.33	0.07
VP-AG/ポリ乳酸	Peak (ms)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.01
	Intensity (mV)	0.48	0.39	0.40	0.42	0.04

図 4. 新たに設計した人工細胞外マトリクスのアミノ酸配列



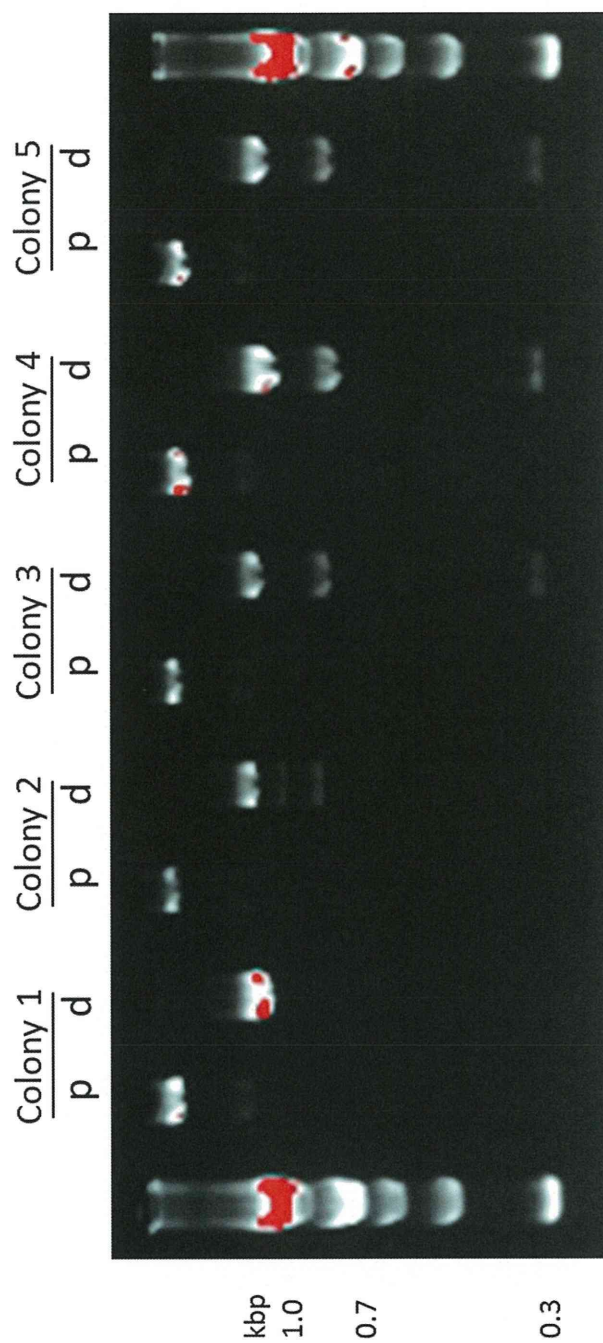


図 5. pUC57((VPGIG₃₀)₂)で形質転換した DH 5 α コンピテントセル (コロニー 1~5) から回収したプラスミドの NdeI/XhoI 消化後のアガロースゲル電気泳動 [p: 未切断プラスミド, d: NdeI/XhoI 消化後]

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGACAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGGCTGGC
TTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGT
AAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGC
GGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCA
GGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGCGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTA
GATCCATGGGGTACCACCACCACCACCATCATCATCATTCAAGCGGTACATCGACGACGACGACAAACA
TATGGGCGGGCTCCGGGCATCGGTGTGCCGGGTATTGGCGTTCGGGTATCGGCGTCCGGGTATTGGCG
TGCCGGGTATCGGCGTTCGGGTATTGGCGTCCGGGTATCGGCGTGCCGGGCATCGGTGTGCCGGCATT
GGTGTTCGGGCATCGGCGTCCGGGCATTGGCGTCCGGGCATCGGTGTTCGGGTATCGGTGTTCGGG
CATTGGTGTCCGGCATCGGCGTTCGGGCATTGGCGTTCGGGCATTGGTGTCCGGGTATTGGTGTTC
CTGGCATCGGCGTGCCTGGTATCGGCGTCCGGCATCGGCGTTCGGGTATTGGTGTTCCTGGAATCGGTGTTCCTGGCATTGGCG
TCCGGGTATTGGTGTCCGGGCATCGGTGTCCCTGGAATCGGCGTTCCTGGCATTGGTGTTCGGGCATCG
GCGTGCCCGCATTGGCGTGCCTGGTATTGGCGGTGGCGGTGTGACGGCGGTGGCGTCCCGGCATTGG
AGTGCCGGGAATTGGTGTCCCTGGCATTGGCGTTCGGGTATTGGTGTTCGGGAATCGGCGTGCCGGAA
TCGGCGTTCGGGCATTGGTGTTCCTGGGATCGGTGTGCCGGGTATCGGTGTCCCTGGAATTGGTGTTCGG
GTATTGGCGTTCCTGGTATCGGTGTTCCTGGCATAGGCGTGCCGGGTATCGGTGTCCGGGCATAGGTGTCC
CTGGCATCGGTGTACCTGGTATAGGCGTCCCGGCATCGGCGTGCCAGGTATTGGCGTCCGGGCATCGGC
GTGCCGGGCATTGGAGTGCTGGTATTGGAGTTCGGGCATCGGAGTCCCTGGTATCGGTGTACCCGGTAT
CGGCGTACCTGGCATTGGTGTTCAGGCATCGGCGTGCCGGGTATTGGCGTCCGGGTATTGGTGTGCCGG
GTATTGGTGGCTCGAGCGGTGTGAGCAGTGAATCATCGGATCCCGGGCCCGTGCAGTGCAGAGGCCTGCA
TGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTACAATCCACACAACAT
ACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCG
CTACTGCCCCGTTTCCAGTCGGGAAACCTGCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGCCAACCGCGGGGAG
AGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTTCCGCTTCTCGCTACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCG
GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGAGGAAAGA
ACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATA
AAGATACCAGGCGTTTCCCTGGAAGCTCCCTGTCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCTTCTCCCTTCCGGAAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT
GGTCTGCTCCAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA
CTATCGTCTGAGTCCAAACCGGTAAGACAGGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCTAACTACGGTACACTAGAAGAAC
AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAA
CAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAAAAAAAGGATCTCAA
GAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTACGTTAAGGGGATTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTAAATAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT
ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTCGT
TCATCCATAGTTGCTGACTCCCGTGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGC
TGCAATGATACCGGAGACCCAGCTCACCAGTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGC
CGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTA
AGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCT
TTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAA
AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATG
GCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAA
GTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTCCCGGCGTCAATACGGGATAATAACCGGCCA
CATAGCAGAACTTAAAAGTGTCTATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGC
TGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCCAGCGTT
TCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAA
TACTCATACTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAA
TGTATTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAA
CCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

図6. pUC57((VPGIG₃₀)₂)の塩基配列
[太字斜体部分が (VPGIG₃₀)₂ をコードした DNA 配列]