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. al.. **Biomacromolecules** et 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。

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 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 2mm)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 レクトロスピニ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3mm)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-G RL-(VPGIG)₃₀-VPLE; VP-AG)は、 大腸菌発現系を用いて生合成した。V P-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 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(3500rpm, 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。砕菌後、 溶液を遠心(10000rpm, 15分,

4)して上清を回収し、0.8µ
 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 で一晩緩やかに撹拌する

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、10~500mM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 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 エレクトロスピニング法で作製した。 まず、ステンレス棒(3.0mm) 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: 10kDa)と VP-AG との質量比を4:1とし、溶質濃度が 20w/v%となるように1,1,1,3,3,3-へ 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 k V/+7.5 k V(電位差15 k V) 溶液射出速度を0.5m1/h、ニード ル-ターゲット間距離を10cmの条 件で、エレクトロスピニング法にて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 k V/+7.5 k V (電位差1)

5 k V) 溶液射出速度を3.0m1/ h、ニードル-ターゲット間距離を1 0 c mの条件でエレクトロスピニン 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: 10k Da)とポリエチレングリコール(Mw: 20kDa)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:3m m,長さ2cm)を、ウサギ(NZW種、 2.8-3.0kg、オス)の脛骨神 経に作製した2cm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2cm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(VPGI 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DN A 配 列 を 挿 入 し た 。 こ の $pUC57((VPGIG_{30})_2) をコンピテント$ セル(DH5, 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 (Rosetta[™], 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 m L 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、タンパク質(VPGIG₃₀)₂ を発現誘導した。大腸菌懸濁液を遠心 (3500rpm, 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。砕菌後、溶液を遠 心(10000rpm, 15分, 4) して上清を回収し、0.8µm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 で一晩緩やかに撹拌することで (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、50mM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 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500mL スケールで発 現誘導し、砕菌後、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(50kDa)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 k Da) 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2.0µm、AG73 ペプチドを混合したもので約1.5 μ m、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2.0µm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2.2cm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ヵ月後 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2mm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0.1 7msec、平均強度は0.35mV 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0.15msec、平均強度は 0.33mV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0.15msec、平均強 度は0.42mV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(VPGIG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 DH 5 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)。シークエンス解析の結 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 ($pET19b((VPGIG_{30})_2)$)。 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56 65bp付近にバンドが確認され、理 論値と一致した(図7)。シークエン 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500m Lスケールで発現誘導し、砕菌後、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混合ファイバーでな 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0.15mV程度と他のチューブ と同様であったが、平均強度が0.4 2mV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0.1 4msec、平均強度は0.86mV 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 (DH5a)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((VPGIG₃₀)₂) で形質転換した Rosetta 株から (VPGIG₃₀)₂を発現誘導することがで きた。(VPGIG₃₀)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、(VPGIG₃₀)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(2) cm)の再生性を評価した。内径2m m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 内径を適官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

(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
 - Sachiro Kakinoki, Tetsuji Yamaoka, Thermoresponsiv e elastin/laminin mimickin g artificial protein for mod ifying PLLA scaffolds in n erve 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 Mori tan, Tetsuji Yamaoka, Nan o-fibrous conduit composed of elastin-laminin mimicki ng artificial protein and po ly (L-lactic acid) for periph eral nerve regeneration, A

dvanced Materials World C ongress (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(2 013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(20 13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

 内層
 外層

 ジャック
 ジャック

 ジャック
 ジャック

VP-AG / ポリ乳酸



図1.各ナノファイバーチ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チューブ



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

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

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



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 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]

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGGTGTCGGGGCTGGC TTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGT AAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGC GGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCA GGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTA GATCCATGGGTCACCACCACCACCATCATCATCATCATCAAGCGGTCACATCGACGACGACGACAAACA TATGGGCGGCGTTCCGGGCATCGGTGTGCCGGGTATTGGCGTTCCGGGTATCGGCGTCCCGGGTATTGGCG TGCCGGGTATCGGCGTTCCGGGTATTGGCGTCCCGGGTATCGGCGTGCCGGGCATCGGTGTGCCGGGCATT GGTGTTCCGGGCATCGGCGTCCCGGGCATTGGCGTCCCGGGCATCGGTGTTCCGGGTATCGGTGTTCCGGG CATTGGTGTGCCGGGCATTGGCGTTCCGGGCATCGGCGTTCCGGGCATTGGTGTCCCGGGTATTGGTGTTC CTGGCATCGGCGTGCCTGGTATCGGCGTGCCTGGCATTGGTGTTCCTGGAATCGGTGTTCCTGGCATTGGCG TCCCGGGTATTGGTGTCCCGGGCATCGGTGTCCCTGGAATCGGCGTTCCTGGCATTGGTGTTCCCGGCATCG GCGTGCCCGGCATTGGCGTGCCTGGTATTGGCGGTGGCGGTGTCGACGGCGGTGGCGTGCCCGGCATTGG AGTGCCGGGAATTGGTGTCCCTGGCATTGGCGTTCCCGGGTATTGGTGTTCCCGGAATCGGCGTGCCCGGAA TCGGCGTTCCCGGCATTGGTGTTCCTGGGATCGGTGTGCCGGGTATCGGTGTCCCTGGAATTGGTGTTCCCG GTATTGGCGTTCCTGGTATCGGTGTTCCTGGCATAGGCGTGCCGGGTATCGGTGTGCCGGGCATAGGTGTCC CTGGCATCGGTGTACCTGGTATAGGCGTCCCGGGCATCGGCGTGCCAGGTATTGGCGTGCCGGGCATCGGC GTGCCGGGCATTGGAGTGCCTGGTATTGGAGTTCCGGGCATCGGAGTCCCTGGTATCGGTGTACCCGGTAT CGGCGTACCTGGCATTGGTGTTCCAGGCATCGGCGTGCCGGGTATTGGCGTGCCGGGTATTGGTGTGCCGG GTATTGGTGGCTCGAGCGGTGCTGAGCAGTGAATCATCGGATCCCGGGCCCGTCGACTGCAGAGGCCTGCA TGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCCACAACAT CTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG AGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCG GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGA ACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG CTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATA AAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTA GGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGCGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCACTGGTAACAGGATTAGC AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAC AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAA CAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGAATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAA GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGT TCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGC AGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGT TTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAA GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAA GTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCA CATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGC TGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTT TCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAA TACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA TGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAA 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]



図 7. pET57((VPGIG₃₀)₂)で形質転換した 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 [p: 未切断プラスミド, d: NdeI/XhoI 消化後]

TTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGGA ACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAAC ATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGC GGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGA TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATC GTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTT TACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCCTTAACGTGAGTTTTCGAT GGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCA CCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGA CGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGT GAGCTATGAGAAAGCGCCACGGCTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG ATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCA CACCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCCGACACC CGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCG TCATCACCGAAACGCGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTCACAGATGTCTGCCTGTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCC AGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGGATTTCTGTTCATGGGGGGTA ATGATACCGATGAAACGAGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTATG6ATG6ATG6CG GCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACA TAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCCGAAGACCATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGCAGTCG CTTCACGTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGC AGAATTGATTGGCTCCAATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCATTCAGGTCGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCG GGGAGGCAGACAAGGTATAGGGCGGCCGCCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCATGTGCTCGCCGAGGCGGCATAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAGTGATCG GAAGCGAGAAGAATCATAATGGGGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTCGCGAACGCCAGCAAGACGTCGGCCGCGGCGGCGGCGATGCCGGCGATAATGGCCTGC TTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCCCAG CGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGAAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCCG CCGCTTTCCAGTCGGGAAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTCAC CAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGCGGCAAAATCCTGTTTGATG CTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGC CGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCG GGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTGGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACT TTTTCCCGCGTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTC ACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGCTGTCCGGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACG GGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCT GTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCCGGTCCGGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAAT TCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGAATATACCATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATA**TCGACGACGACGACGACAA** GCATATGGGCGGCGTTCCGGGCATCGGTGTGCCGGGTATTGGCGTTCCGGGTATCGGCGTCCCGGGTATCGGCGTGCCGGGTATCGGCGTCCGGGTATTGGCGTC CGGGCATTGGTGTGCCGGGCATTGGCGTTCCGGGCATCGGCGTTCCGGGCATTGGTGTCCCGGGTATTGGTGTCCTGGCATCGGCGTGCCTGGCATCGGCGTGCC TGGCATTGGTGTTCCTGGAATCGGTGTTCCTGGCATTGGCGTCCCGGGGTATTGGTGTCCCGGGCATCGGTGTCCCTGGAATCGGCGTTCCTGGCATTGGTGTCCCG GCGTTCCGGGGTATTGGTGTCCCGGAATCGGCGTGCCCGGAATCGGCGTTCCCGGCATTGGTGTTCCTGGGATCGGTGTGCCGGGTATCGGTGTCCCTGGAATTGG TGTTCCCGGTATTGGCGTTCCTGGTATCGGTGTTCCTGGCATAGGCGTGCCGGGTATCGGTGTGCCGGGCATAGGTGTCCCTGGCATCGGTGTACCTGGTATAGGCG TCCCGGGCATCGGCGTGCCAGGTATTGGCGTGCCGGGCATCGGCGTGCCGGGCATTGGAGTGCCTGGTATTGGAGTTCCGGGCATCGGAGTCCCTGGTATCGGTGT ACCCGGTATCGGCGTACCTGGCATTGGTGTTCCAGGCATCGGCGTGCCGGGTATTGGCGTGCCGGGTATTGGTGCCGGGTATTGGTGGCTCGAGCGGTGCTGA CATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTCATACACGGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGT GATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAA

図 8 . pET19b((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]



図 9 .pET57((VPGIG₃₀)₂)で形質転換した Rosetta コンピテントセルを用いて発 現誘導後、砕菌したライセートの SDS-PAGE [赤丸は(VPGIG₃₀)₂を示す。]