

## 別添 4

### 総説・著書等

| 著者氏名          | 論文タイトル名  | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名                     | 出版社名     | 出版地 | 出版年  | ページ          |
|---------------|--|-----------|---------------------------|----------|-----|------|--------------|
| 柿木佐知朗<br>山岡哲二 | 神経   | 技術情報協会    | 再生医療における臨床研究と製品開発         | 技術情報協会   | 東京  | 2013 | 35<br>-      |
| 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 - | 日本ペプチド学会  | PEPTIDE NEWS LETTER JAPAN | 日本ペプチド学会 | 大阪  | 2013 | 9<br>-<br>13 |

## [2] 神経

胞の  
細胞  
され  
しれ  
も可  
細胞

はじめに

神経組織は、脳内における情報処理と脳・器官間の情報伝達という重要な役割を担っており、中枢神経系と末梢神経系に大別される。神経組織が内・外因性神経疾患や外傷によって損傷・障害を受けると、感覚機能や運動機能が損なわれて日常生活に大きな支障をきたす。高齢化社会の益々の進展に伴って老人性認知症やパーキンソン病、糖尿病性神経障害などの患者数の急増が予想され、その抜本的な治療法としての神経再生医療の実現が望まれている。

これまで神経再生は、末梢神経系を主として研究されてきた。その理由は、中枢神経系と末梢神経系とでその再生能が全く異なることにある。中枢神経系はニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトといった再生能のない細胞群から成っているのに対し、末梢神経系は軸索とシュワン細胞よりなる構造の単純な線維状組織でかつその再生能が極めて高いことに起因する。近年、中枢神経系障害に対する神経幹細胞移植の有効性が動物実験で証明されるまでに至っているが、安全性の評価などのために臨床応用されるまでにはもう暫くの年月を要するであろう。一方の末梢神経再生については、細胞の移植を伴わない組織工学的アプローチによって自家神経に代わる神経再生誘導管が開発され、世界的に優れた臨床成績を挙げている。本節では、この末梢神経再生用の神経再生誘導管（人工神経）にフォーカスを当て、現況ならびその問題点と筆者らの取組みについて紹介する。

関す

### 1. 末梢神経の障害と再生

#### 1.1 末梢神経障害

末梢神経障害（ニューロパチー）は、断裂や挫滅などの機械的神経損傷や糖尿病などの疾病によって惹起され、自己再生や薬剤療法による改善が見込めない場合は、欠損部を外科的に再建する必要がある。重度の神経損傷は、放置すると神経腫が形成されて疼痛を引起すため、一般的には直接縫合によって修復される。しかし、端々吻合が困難な損傷では、腓腹神経などの自家神経移植によって欠損部を架橋することによって再建される。自家神経移植は、再生不全や過誤支配による後遺症やドナー採取部位の知覚欠損や疼痛などの問題があり、それに代わる人工神経の開発が望まれている。

#### 1.2 末梢神経の再生

末梢神経組織は、軸索、シュワン細胞、髄鞘（ミエリン鞘）、血管、線維芽細胞、基底膜ならび結合組織によって構成されている（図1）。末梢神経は、神経細胞から伸びた軸索にシュワン細胞が巻きついて形成される絶縁体の髄鞘を有する有髄線維および、複数の軸索を1つのシュワン細胞が取り込んで髄鞘を有さない無髄線維が、各々神経周膜によって束ねられて神経束を形成し、さらにそれらが神経外膜によって束ねられた構造をしている。神経内膜および周膜は、血液神経関門（blood-nerve barrier: BNB）を形成しており、血液循環系から隔離された神経系内部環境を維持している。神経が損傷（切断・圧挫）してBNBが破綻すると、損傷部位より遠位で軸索および髄鞘の変性（Waller変性）が起こり、それらはマクロファージによって貪食される（図2-②）。その際、変性したシュワン細胞は神経再生因子である神経増殖因子（nerve growth factor: NGF）やグリア細胞株由来神経栄養因子（glial cell line-derived neurotrophic factor: GDNF）を合成することが知られており<sup>1,2)</sup>、それらに応答して中枢側からシュワン細胞の増殖および分化と再生軸索の伸長が誘導される（図2-③）。軸索が標的組織・臓器に到達し、シュワン細胞の分化（再髄鞘化）によって末梢神経再生が完了する（図2-④）。切断や圧挫による短距離の損傷の場合、この自然治癒もしくは直接吻合によって末梢神経は再生される。しかし、数cmに亘る長距離の損傷の場合、再生軸索は標的を失って無秩序に伸長するために機能回復には至らない。そのため、欠損部位を架橋する人工神経には再生軸索を標的へ導く構造（誘導路）と、その再生を促進する生理的機能（足場）が求められる。

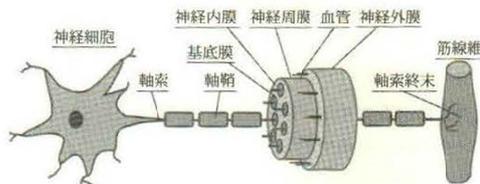


図1 末梢神経の構造

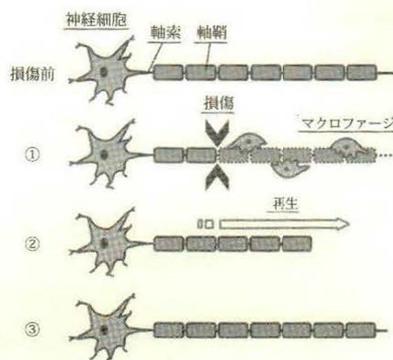


図2 末梢神経の損傷と再生

## 2. 神経再生誘導管（人工神経）

### 2.1 神経再生誘導管開発の変遷と現状

自家神経に代わる神経再生誘導管の開発は、1982年のLundborgらによるシリコンチューブを用いた神経欠損部の架橋に関する報告<sup>3)</sup>を皮切りに活発に試みられてきた。また、コラーゲン<sup>4)</sup>やポリ乳酸・グリコール酸およびその共重合体<sup>5,6)</sup>などを基材としたチューブが検討されたものの十分な神経再生能を示さなかったため、チューブの内部にコラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリクス<sup>7,8)</sup>や、繊維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor: FGF）などの増殖因子<sup>9,10)</sup>を含有したハイドロゲルを充填することで神経再生の促進が図られた。その後、柔軟性や液性成分の透過性を向上させるためにメッシュや不織布よりなるチューブが登場し、現在は乳酸-グリコール酸共重合体のメッシュで構成される生体分解吸収性チューブ内にコラーゲンを充填した神経再生誘導管が日本でも臨床応用されるに至っている<sup>11)</sup>。この神経再生誘導管は、極めて良好な臨床成績を挙げつつあり、これから利用が益々広がると期待されている。一方で、高純度とはいえ動物由来のコラーゲンが使用されていることから、ウイルス感染などの生物学的危険性が常に懸念される。また、生体に移植された際、基材の高分子材料は異物であり、かつメッシュ状構造であることから周辺結合組織の強い癒着も免れない。このような課題を解決すべく、筆者らは人工タンパク質と生体分解性高分子を組み合わせた新しい神経再生誘導管の研究開発に取り組んでいる。

### 2.2 神経再生性ペプチドで修飾した神経再生誘導管

神経再生誘導管には、(1)神経再生が完了する期間までの標的組織への誘導路の確保、(2)神経再生を促進する足場、(3)縫合等に耐える操作性と柔軟性、(4)外部結合組織の侵入および癒着を防止し、かつ液性成分が透過できる構造、(5)

神経再生終了後に消失する分解吸収性、(6) 動物由来材料や化学架橋剤を用いない高い生体安全性といった特性が求められる。

筆者らのグループでは、神経再生性ペプチドで機能化されたポリ乳酸ナノファイバー神経誘導管の開発を試みている。ポリ乳酸は、加工性、力学的特性および生体内分解吸収性に優れており、神経誘導管の基材として有用である。しかし、ポリ乳酸は生体的に不活性であるため、先述したようにコラーゲンなどの生理活性分子で神経再生性を付与する必要がある。また近年は、動物由来タンパク質の使用を避けるために、それらの活性部位のみを抽出した短鎖ペプチドが容易に化学合成できることから生理活性分子として多用されている。これらペプチドは、単にコーティングするのみでは生理活性を長期間維持することは難しく、何らかの物理化学的な手法によってポリ乳酸の基材表面へ安定に生理活性分子を導入しなければならない。ポリ乳酸は分子構造内に反応性官能基を有しておらず、プラズマ照射<sup>12)</sup>、加水分解反応<sup>13)</sup>やアミドリシス反応<sup>14)</sup>によって導入された反応性官能基を介して基材表面への分子修飾が試みられてきたが、簡便かつ汎用性の高いポリ乳酸基材表面修飾法はこれまで存在しなかった。

筆者らは、オリゴD-乳酸/神経再生性ペプチド複合体を用いた新しいポリL-乳酸基材表面修飾法を開発し、その神経再生誘導管への応用を検討してきた<sup>15,16)</sup>。この方法は、ポリ乳酸の2つの光学異性体(D体とL体)が安定なステレオコンプレックスを形成する特性<sup>17)</sup>を利用したもので、オリゴD-乳酸と生理活性ペプチドの複合体をポリL-乳酸に混合し、相分離しないように急速に脱溶媒することによってポリ乳酸基材表面にペプチドを均一に導入するものである(図3)。筆者らは、オリゴD-乳酸/ラミニン由来神経再生性ペプチド(IKVAV<sup>18)</sup>もしくはAG73<sup>19)</sup>複合体を合成し、ポリL-乳酸との混合溶液(質量比:ポリ乳酸/複合体=97/3)からフィルムを作製してPC12細胞(ラット副腎褐色細胞腫)の突起伸長活性を評価し、ペプチドを修飾することでその活性が顕著に促進されることを示した。さらに、電界結糸(エレクトロスピンニング)法によって作製したペプチド修飾ポリ乳酸ナノファイバー神経再生誘導管で、ラットの坐骨神経に作製した10mmの神経欠損を架橋して24週後に神経再生を組織学的および電気生理学的に評価した(図4-①)。誘導管を作製する際、結合組織の癒着を防止するために最外層はポリL-乳酸にポリエチレングリコールを混合して紡糸した。その結果、誘導管は生体内で分解されており、その内部でのGFAP(glial fibrillary acidic protein)およびニューロフィラメント陽性神経組織の再生が認められた(図4-②)。電気生理学的評価でも、誘導管移植部中枢側からの電気的刺激によって脛骨筋電位を検出することができたことから、再生した神経組織が機能していることも明らかとなった(図4-③)。このオリゴD-乳酸/ラミニン由来神経再生性ペプチド複合体によって機能化されたポリL-乳酸ナノファイバー神経再生誘導管は、前述した要件全てを満たしており、より緻密な分子設計や組成の最適化によって更なる機能の向上が期待される。

損部の  
の共重  
コラー  
ゲン<sup>9,10)</sup>  
上させ  
れる生  
この神  
高純  
れる。  
の強い  
しい神

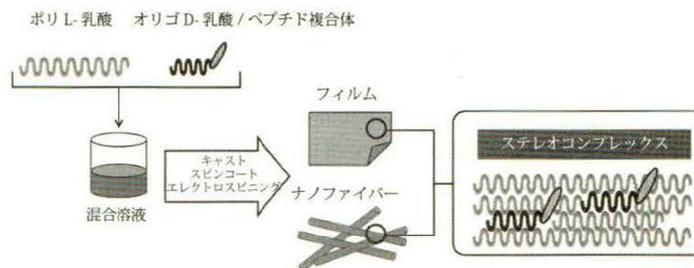


図3 オリゴD-乳酸/ペプチド複合体を利用したポリL-乳酸基材の生理的機能化

易(3)  
、(5)

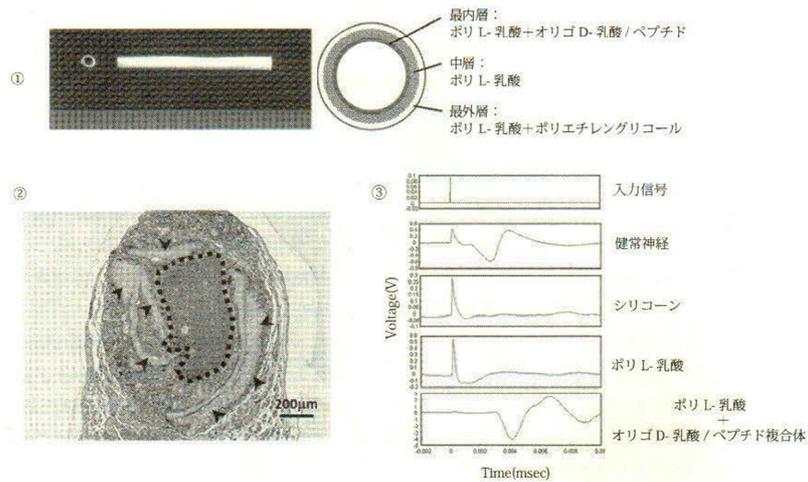
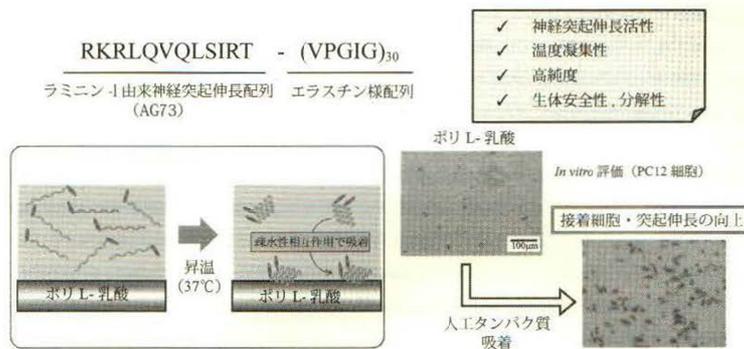


図4 オリゴD-乳酸/ペプチド複合体で機能化されたポリL-乳酸ナノファイバー神経再生誘導管を用いたラット末梢神経再生  
 ① ナノファイバー神経誘導管  
 ② ラット坐骨神経欠損モデルへ移植 24 週後の誘導管中央部の断面 GFAP 免疫染色像 (点線部が GFAP 陽性, 矢印は残存している誘導管)  
 ③ 移植 24 週後脛骨筋の電位測定結果 (文献 16 の図を一部改編)

### 2.3 人工タンパク質を利用した神経再生誘導管の機能化

1991 年, Tirell らによって (Ala-Gly)<sub>n</sub> 繰返し配列の生合成<sup>20)</sup> が報告されて以降, 細胞外マトリクス (ECM) タンパク質を模倣した人工タンパク質の組織再生用足場材料としての応用が多く試みられてきた。これら人工タンパク質は, 生物学的危険性が無く, かつ必要な機能や構造を自由に組み合わせられることが大きな特徴である。

筆者らは, ポリ乳酸神経再生誘導管の機能化分子として, エラスチン-ラミニン複合型人工タンパク質を大腸菌発現系にて生合成した (図 5)。この人工タンパク質は, エラスチン骨格の繰返し配列 ((VPGIG)<sub>n</sub>)<sup>21)</sup> とラミニン-I 由来配列 (AG73) 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。得られた高純度のエラスチン-ラミニン複合型人工タンパク質を, 温度応答性を利用してポリ乳酸フィルムやファイバー表面へ吸着させたところ, その表面で PC12 細胞の接着および突起伸長が顕著に向上した。これらの結果から, 本研究の温度応答性人工タンパク質を用いたポリ乳酸基材へのペプチド導入法は, 組織再生用スキャホールドの簡便な生理的機能化法として応用が期待される。さらに筆者らは, このエラスチン-ラミニン複合型人工タンパク質とポリ乳酸との混合型ナノファイバー神経再生誘導管を作製し, ウサギ坐骨神経欠損モデルでの評価にも着手している。



おわりに

末梢神経再生に関する現状と筆者らの研究を中心に紹介させて頂いた。末梢神経再生誘導管は既に臨床で応用されており、他の多くの再生医学デバイスが研究段階にあることを考えるとよく進捗しており、筆者らが取り組んでいるペプチド・人工タンパク質などによって一層の改質が期待される。一方で、中枢神経障害を対象として、内在性もしくは胚性幹細胞 (Embryonic stem cells; ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) から分化させた神経幹細胞を移植する研究も大きく進展している。神経幹細胞移植と末梢神経再生の研究で培った組織工学的技術とが融合することで、全神経障害を克服できる再生医療の早期実現に向けた研究が一層加速するに違いない。

## 文 献

- 1) Ralf H, Sigrun K, Christine B, Hans T. : Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J. Cell Biol.* 104(1987)1623-1631
- 2) Naveilhan P, ElShamy WM, Ernfors P. : Differential Regulation of mRNAs for GDNF and its Receptors Ret and GDNFR $\alpha$  After Sciatic Nerve Lesion in the Mouse. *Eur. J. Neurosci.* 9(1997)1450-1460
- 3) Lundborg G, Dahlin BL, Danielsen N, Gelberman HR, Longo MF, Powell CH, Varon S. : Nerve regeneration in silicone chambers: Influence of gap length and of distal stump components. *Exp. Neurol.* 76 (1982) 361-375
- 4) Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu H-P, Strichartz G, Spector M. : Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp. Neurol.* 154(1998)315-329
- 5) Molander H, Olsson Y, Engkvist O, Bowald S, Eriksson I. : Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube. *Muscle Nerve* 5(1982)54-57
- 6) Kiyotani T, Teramachi M, Takimoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Endo K. : Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res.* 740(1996)66-74
- 7) Madison RD, Da Shilva CF, Dikkes P. : Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. *Brain Res.* 447(1988)325-334
- 8) Chen Y-S, Hsien C-L, Tsai C-C, Chen T-H, Cheng W-C, Hu C-L, Yao C-H. : Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 21(2000)1541-1547

- 9) Cordeiro PG, Seckel BR, Lipton SA, D'Amore PA, Wagner J, Madison R. : Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast. Reconstr. Surg.* 83(1989)1013-1019
- 10) Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Shoichet MS. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J. Neurosurg.* 99(2003)555-565
- 11) Ichihara S, Inada Y, Nakada A, Endo K, Azuma T, Nakai R, Tsutsumi S, Kurosawa H, Nakamura T. : Development of new nerve guide tube for repair of long nerve defects. *Tissue Eng. Part C Methods.* 15(2009)387-402
- 12) Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N. : Plasma-surface modification of biomaterials. *Mat. Sci. Eng.* R36(2002)143-206
- 13) 山岡哲二, 竹部義之, 木村良晴 : ポリ乳酸フィルム表面の新規化学修飾法と細胞接着性の付与. *高分子論文集* 55(1998)328-333
- 14) Croll TI, O'Connor AJ, Stevens GW, Cooper-White JJ : Controllable surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: Physical, chemical, and theoretical aspects. *Biomacromol.* 5(2004) 463-473
- 15) Yamaoka T, Uchida S, Higami T, Murakami A. : Immobilization of bioactive molecules onto PLLA porous matrices for tissue regeneration, International chemical congress of pacific basin societies, Hawaii, USA, 2005; Program No. 482
- 16) Kakinoki S, Uchida S, Ehashi T, Murakami A, Yamaoka T. : Surface Modification of Poly(L-lactic acid) Nanofiber with Oligo(D-lactic acid) Bioactive-Peptide Conjugates for Peripheral Nerve Regeneration. *Polymers* 3(2011)820-832
- 17) Ikada, Y, Jamshidi, K, Tsuji, H, Hyon, S-H. : Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactides). *Macromolecules* 20(1987)904-906
- 18) Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Yamada Y. : A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 25(1989)16174-16182
- 19) Nomizu M, Kuratomi Y, Malinda KM, Song S-Y, Miyoshi K, Otaka A, Powell SK, Hoffman MP, Kleinman H, Yamada Y. : Cell binding sequences in mouse laminin $\alpha$ 1 chain, *J. Biol. Chem.* 273(1998) : 32491-32499
- 20) Creel HS, Fournier MJ, Mason TL, Tirrell DA. : Genetically directed syntheses of new polymeric materials: efficient expression of a monodisperse copolypeptide containing fourteen tandemly repeated -(AlaGly) $_4$ ProGluGly- elements. *Macromolecules* 24(1991)1213-1214
- 21) Yamaoka T, Tamura T, Seto Y, Tada T, Kunugi S, Tirrell DA. : Mechanism for the Phase Transition of a Genetically Engineered Elastin Model Peptide (VPGIG) $_4$  in Aqueous Solution. *Biomacromolecules* 4(2003)1680-1685

に向けて、2量体構造を作製し、またC末端領域から得られている活性ペプチドであるT20とSC34EK<sup>9)</sup>についても同様に単量体、2量体、3量体を作製し、それぞれの活性の違いについて検討しました。(図7)。結果として、C34は2量体においても3量体と同様の高い活性を有することが明らかになりました<sup>9)</sup>。また、T20、SC34EKについては多量体化による顕著な活性の向上は得られないこともわかりました。C34配列は比較的ランダムな構造を有することが結晶構造から明らかにされています。それと比較してT20は、C末端側の疎水性領域が宿主膜と相互作用することが示唆されている点、SC34EKはグルタミン酸-リジンによる塩橋を形成させることでヘリックス構造が誘起されている点が大きく異なります。C34の多量体化による活性の顕著な向上に関してはまだまだ研究を進める必要がありますが、新規な作用に基づく膜融合阻害活性をもつ分子として有用であると考えられます。これらの成果では複数の特許を出願しており、新たな抗HIV戦略を示すものとして注目されています。また、所属研究室で進行しているプロジェクトではHIV由来タンパク質群のペプチドライブラリーから感染阻害活性を有するペプチドを見出すことにも成功しており、その推進に注力しています<sup>10-13)</sup>。

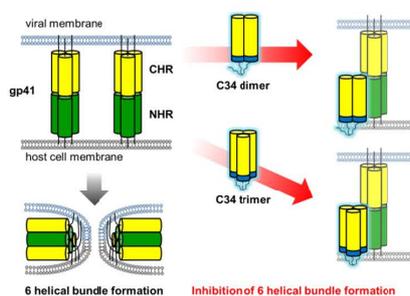


図7 HIV膜融合過程で生じるヘリックスバンドルを模倣したペプチドによる6ヘリカルバンドル形成の阻害機構について C34三量体が単量体と比較して100倍強い阻害活性を示すことを明らかにし、最近の研究では二量体構造が活性の発現に重要であることも見出した。

#### おわりに

著者は、これら以外にも、DNA結合タンパク質であるジンクフィンガードメインを利用した新規人工酵素の開発研究<sup>14, 15)</sup>やプロテインキナーゼのリガンド結合部位に環境応答性蛍光基を導入したセンサー機能を持つペプチドの開発研究<sup>16-19)</sup>、ZIPタグ-プローブペア<sup>19)</sup>の細胞内タンパク質ダイナミクスの可視化への応用に関する研究<sup>20)</sup>など、生体分子間の相互作用に着目するという点に基づき、ペプチドを利用することで新たな研究領域の開拓を試みています。

最後になりますが、ここで紹介した研究は東京医科歯科大学生体材料工学研究所 玉村啓和教授のご指導

の下で行ったものであり、玉村教授に心より感謝申し上げます。また、研究を遂行するにあたってご協力いただいた多くの学生諸氏、共同研究者の先生方に改めて御礼申し上げます。ペプチド化学はさまざまなアプローチが可能であり、非常に魅力的な学問です。これからも更なる研究の発展に取り組み、研鑽を積み上げていく所存です。今後ともご指導、ご鞭撻のほど、よろしく申し上げます。

- 1) Tamamura, H. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253; 877-882, 1998.
- 2) Fujii, N., *et al. Angew. Chem., Int. Ed.* 42; 3251-3253, 2003.
- 3) Nomura, W., *et al. Bioconjugate Chem.* 19; 1917-1920, 2008.
- 4) Tanaka, T., *et al. J. Am. Chem. Soc.* 132; 15899-15901, 2010.
- 5) Nakahara, T., *et al. Bioconjugate Chem.* 21; 709-714, 2010.
- 6) Hashimoto, C., *et al. Bioorg. Med. Chem.* 20; 3287-3291, 2012.
- 7) Nomura, W., *et al. ChemMedChem* 7; 205-208, 2012.
- 8) Otaka, A., *et al. Angew. Chem., Int. Ed.* 41; 2937-2940, 2002.
- 9) Nomura, W., *et al. Bioorg. Med. Chem.* 21; 4452-4458, 2013.
- 10) Narumi, T., *et al. Bioorg. Med. Chem.* 20; 1468-1474, 2012.
- 11) Suzuki, S., *et al. J. Med. Chem.* 53; 5356-5360, 2010.
- 12) Suzuki, S., *et al. Bioorg. Med. Chem.* 18; 6771-6775, 2010.
- 13) Nomura, W., *et al. ACS Chem. Biol.* in press.
- 14) Nomura, W., Barbas CF, III. *J. Am. Chem. Soc.* 129; 8676-8677, 2007.
- 15) Nomura, W., *et al. Biochemistry* 51; 1510-1517, 2012.
- 16) Nomura, W., *et al. Bioconjugate Chem.* 22; 923-930, 2011.
- 17) Nomura, W., *et al. ChemBioChem* 12; 535-539, 2011.
- 18) Ohashi, N., *et al. Bioconjugate Chem.* 22; 82-87, 2011.
- 19) Tsutsumi, H., *et al. Angew. Chem., Int. Ed.* 48; 9164-9166, 2009.
- 20) Nomura, W., *et al. Biopolymers (Pept. Sci.)* 94; 843-852, 2010.

のむら わたる  
東京医科歯科大学生体材料工学研究所  
メデイシナルケミストリー分野  
nomura.mr@tmd.ac.jp

#### ペプチド複合型 バイオアクティブバイオマテリアル ー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ー

#### はじめに

バイオマテリアルは、血液成分、血球、細胞、組織や臓器などの生体成分に接触する材料のことであり、様々な医療用デバイスの構成素材として広く利用されている。2012年の日本人(女性)の平均寿命は86歳で、筆者の生まれた1978年の78歳か



柿木佐知朗

ら8年も長くなった。生活習慣病の発症数が増加しているにも関わらず平均寿命が大幅に延長したのは、医療技術の飛躍的な進歩による。医薬品や医療検査機器の熾々たる発展に並んで、人工臓器などの医療用デバイスも着実に進歩を遂げてきた。さらに近年は、再生医療や組織工学が注目されており、バイオマテリアルは一層大きな役割を担いつつある。

生体組織の構造や機能は、主に細胞外マトリクス(ECM)タンパク質によって維持されている。バイオマテリアルの大きな目的は生体組織の代替えであることから、生体組織の模倣、すなわち人工的なECMの創製が基本的な開発戦略となる。人工材料と生体組織との大きな隔たりを橋渡しするために様々な生体活性ペプチドが利用されている。本稿では、バイオマテリアル、組織工学およびバイオアクティブバイオマテリアルの概説と、筆者らの研究の一例としてポリ乳酸スキャホールドへのペプチドの固定化法と末梢神経再生誘導チューブへの応用について紹介する。

#### 組織工学 (ティッシュエンジニアリング)

まず、日本ペプチド学会の先生方にはあまり馴染がないであろう組織工学 (ティッシュエンジニアリング) について紹介する。筆者が幼少の頃、ウーパールーパーと呼ばれる大人気であったメキシコソラマnder (アホートル) は、尻尾はもちろんのこと、肢、脳、心臓などの一部を失っても再生する能力がある。一方、我々ヒトの組織は構造および機能を一度失うと再生することはない。しかし、切り傷程度であれば治癒するように、我々も自然治癒力を備えている。細胞の分化や増殖、さらには組織の構築をバイオマテリアルよりなる足場材料 (スキャホールド) で制御することによって自然治癒力を最大限に高めて、アホートルのように失った組織を再生修復させようとする治療法が組織工学である。バイオマテリアルを用いた組織再生の誘導は、1980年代から末梢神経や歯周組織を対象に、Guided tissue regeneration (GTR) と呼ばれて検討されてきた。1993年にJ. Vacantiハーバード大学教授とR. Langerマサチューセッツ工科大学教授らがヌードマウスの皮下に軟骨組織を作製し、ティッシュエンジニアリングという概念を提唱して以降は、この呼び名が広く普及している<sup>1</sup>。Vacantiらの報告では、グリコール酸-乳酸共重合体の多孔質足場材料に軟骨組織を播種し、それをヌードマウスの皮下に移植することで軟骨組織を作製した。ヒトの耳を背負ったVacanti mouse<sup>2</sup>の写真が御記憶にある先生方もいらっしゃるのではないだろうか。厳密には、細胞を用いず足場材料のみで組織再生を誘導するアプローチをGTR、足場材料と細胞とを組み合わせたアプローチを組織工学と区別するが、いずれにおいても足場材料は重要な役割を担っている。また、近年はES細胞やiPS細胞、体性幹細胞などの作製および採取法が確立されつつあり、それらの大量培養や分化制御を目指した培養基材としてのバイオマテリアル開発も盛んである。組織工学や再生医療では、最適な細胞外環境 (足場) を構築し、組織再生に有利な生体反応を誘導する能力がバイオマテリアルに求められる。そのために有用な技術が、後述のバイオアクティブバイオマテリアルで

ある。

#### バイオアクティブバイオマテリアル

バイオマテリアルは、コンタクトレンズや外科用縫合糸など身近なものから、人工血管、人工心臓、ステント、歯科用インプラント、透折用中空糸やカテーテルなどに用いられている。人工材料はウイルスや病原体とは異なり、生体にとって極めて特殊な異物であるため、それらが埋入されると炎症や血液凝固などに加えて、カプセル化などの反応が惹起される。そのため、いかにして生体の免疫系を欺き共存できるバイオマテリアルを開発するかが重要となる。これまでは、生体に馴染み (生体親和性)、かつ血液が凝固しない (血液適合性) こと、すなわち 'バイオイナート' を要点として、高分子 (合成・天然)、金属やセラミックスなどのバイオマテリアルが開発されてきた。しかし、実際の医療用デバイスでは、生体組織とデバイスとの接合部や人工血管の内腔など、特定の細胞や組織との積極的な接着が要求される場合も多い。さらに、組織工学用の足場材料には、生体内で細胞や組織に能動的に機能する 'バイオアクティブ' なバイオマテリアルが求められている<sup>3</sup>。

バイオアクティブバイオマテリアルの開発における基本的な戦略は、人工材料による生体組織の模倣である。ご存じの通り、生体の機能および恒常性は様々な分子によって支えられており、その中でもタンパク質の役割は極めて大きい。特に、コラーゲンなどのECMとサイトカインやケモカインなどの増殖因子は生体の治癒や再生を緻密に制御しており、バイオマテリアルにとって最も必要となる機能を備えた生体活性分子である。しかし、ECMおよび増殖因子が織りなす多様な機能やナノ構造を人工的に複製することは現状では不可能である。多くの場合、タンパク質の生理機能の発現には構成する全アミノ酸が寄与している訳ではなく、数〜数十残基程度のアミノ酸配列 (活性部位) が機能している。分子生物学の進展に伴い、多くの活性配列がECMタンパク質から同定されている (表1)。活性配列 (ペプチド) を利用することで、必要とする生理的機能を人工材料に化学的に複合することが可能となる。このようなアプローチは1990年代から試みられており、その代表的なものにフィブロネクチン由来のインテグリン結合配列であるArg-Gly-Asp (RGD) で修飾された細胞接着性バイオマテリアルがある<sup>4</sup>。また、本稿では詳細は割愛するが、Urry<sup>5</sup> やTirell<sup>6</sup>らの人工エラスチンのように基本構造を模倣して設計された人工タンパク質や、Zhangらの $\beta$ -sheet型自己凝集ハイドロゲル<sup>7</sup>などもバイオアクティブバイオマテリアルの例として挙げられる。従来のバイオマテリアルの生体親和性 (バイオイナート) や分解吸収性に加えて生体活性が導入されたバイオアクティブバイオマテリアルは、新たな医療用デバイスの開発に有用と期待されている。この期待を現実のものとするためには、臨床応用を見据えた明確なターゲットの選定と最適なデバイス設計 (加工法や基材) およびペプチド修飾法が重要となる。筆者らは、末梢神経再生誘導チューブの開発を目指し、生体分解性高分子であるポリ乳酸へのペプチド修飾法を検討している。

**コラーゲン様ペプチドの物理吸着を利用したポリ乳酸スキャホールドの機能化**

ポリ乳酸は、生体内に埋入されると乳酸に加水分解され、最終的には代謝される。また、力学的強度や加工性にも優れており、ファイバー、スポンジ、フィルムやプレートなどの成型も容易で、生体分解吸収性の外科用縫合糸や骨固定・接合材として臨床利用されている。しかしながら、細胞や組織との親和性は乏しく、ポリ乳酸の生理的機能化が望まれている。また、我々がターゲットとしている末梢神経再生誘導チューブにおいても、臨床に用いられているものはポリ乳酸を基材としており、神経再生性を補うために動物由来のコラーゲンが内腔に充填されている。生物学的な危険性を踏まえると、動物由来タンパク質の利用は可能な限り避けることが好ましい。そのため、ポリ乳酸へのペプチドなどの生理活性分子の修飾法の研究は盛んに行われてきた<sup>8</sup>。ポリ乳酸は分子内に反応性官能基を持たないため、異なるポリマーとの共重合、プラズマ照射、表面加水分解によって反応性官能基を導入し、それを介した生理活性分子の固定化が報告されている。しかし、これらの方法ではポリ乳酸の分子量の低下や加水分解速度の促進などの問題があった。そこで我々は、簡便性に優れ、かつポリ乳酸の特性を損なわないペプチド修飾法として物理吸着に注目して検討した。

我々はコラーゲン様繰り返し配列 ((Pro-Pro-Gly)<sub>5</sub>)<sup>9</sup> を吸着リンカーとして用いた。また、ポリ乳酸を基材とした末梢神経再生誘導チューブへの応用を想定し、活性配列として東京薬科大学 野水基義教授らによって同定されたラミニン由来のAG73 (Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr)<sup>10</sup> を選択し、AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> という配列のペプチドを設計した。ポリ乳酸は疎水性高分子であることから、(PPG)<sub>5</sub> セグメントが疎水性吸着し、結果としてポリ乳酸表面にAG73が固定された人工ECM層を構築しようというのが本アプローチである(図1)。ポリ乳酸のフィルム(分子量約13万; φ=6.0mm, t=0.5mm)を作製し、1mLのAG73ペプチドもしくはAG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub> (いずれも10μM) に24時間浸漬した。純水もしくは塩化ナトリウム水溶液(1.0M)で洗浄後、フィルム上で神経幹細胞のモデル細胞として用いられているラット副腎褐色細胞腫(PC12細胞)を神経成長因子(NGF)存在下で培養して接着数および神経突起数を評価した。そ

の結果、純水で洗浄した場合はAG73ペプチドとAG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>の両者においてPC12細胞の接着数および分化傾向に顕著な差は認められなかった。しかし、塩化ナトリウム水溶液で洗浄した場合、AG73ペプチドでは急激に細胞接着数が減少したのに対し、AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>では純水で洗浄した場合とほぼ同様の活性を維持することができた(図2)。この結果は、AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>がポリ乳酸フィルム上に強固に吸着し、AG73が安定に固定化されていることを示唆している。このようなアプローチは極めて単純に思えるが、物理吸着のみでポリ乳酸をペプチドで修飾することができれば、その臨床的意義は極めて大きい。

**オリゴ乳酸-ペプチド複合体を用いたポリ乳酸スキャホールドの機能化**

先の物理吸着は簡便性には優れているものの、生体内で長期間保持することは難しいと考えられる。細胞の接着(接触)や血清タンパク質の吸着などは移植直後に惹起されるため、それらの制御を目的とする場合は物理吸着によるペプチドの固定でも十分な効果が得られるであろう。しかし、組織の再生を誘導したい場合は、固定化されたペプチドは細胞が遊走してくるまでは保持されなければならない。末梢神経の再生を考えると、チューブ移植後にシュワン細胞の増殖と軸索の伸長が誘導されるまでペプチドを維持する必要がある。神経再生誘導チューブには(1)神経再生が完了する期間までの標的組織への誘導路の確保、(2)神経再生を促進する足場、(3)縫合等に耐える操作

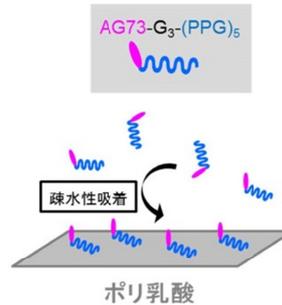


図1 物理吸着を利用したポリ乳酸へのペプチドの固定

表1 ECMタンパク質から同定された細胞接着性配列の例

| Sequences    | Origin                      | Function                        |
|--------------|-----------------------------|---------------------------------|
| RGD          | Fibronectin, Vitronectin    | Cell adhesion                   |
| REDV         | Fibronectin (CS-III domain) | Endothelial cell adhesion       |
| LDV          | Fibronectin (CS-I domain)   | Endothelial cell adhesion       |
| YIGSR        | Laminin                     | Cell adhesion                   |
| LRAHAVDVNG   | N-cadherin                  | Cadherin-mediated cell adhesion |
| KRSR         | Heparin binding domain      | Cell adhesion (Osteoblast)      |
| GFOGER       | Collagen                    | Cell adhesion                   |
| WRTQIDSPLNGK | VCAM-1                      | Endothelial cell adhesion       |

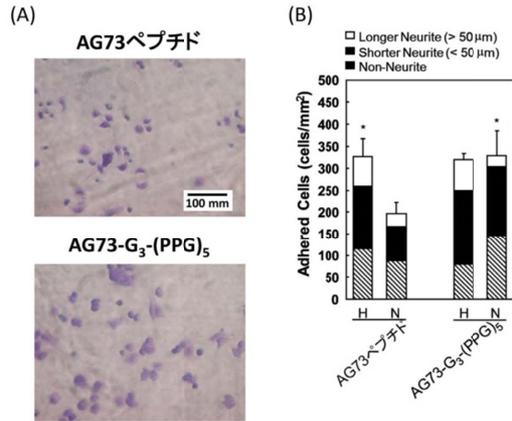


図2 AG73-G<sub>3</sub>-(PPG)<sub>5</sub>を吸着固定したポリ乳酸フィルム上でのPC12細胞の接着と神経突起の伸長<sup>9</sup>  
 (A) NaCl水溶液で洗浄後のフィルム上でのPC12細胞  
 (B) 純水 (H) とNaCl水溶液 (N) で洗浄後の各フィルム上でのPC12細胞の接着数と突起伸長

性と柔軟性、(4) 外部結合組織の侵入および癒着を防止し、かつ液性成分が透過できる構造、(5) 神経再生終了後に消失する分解吸収性、(6) 動物由来材料や化学架橋剤を用いない高い生体安全性といった特性が求められる。そのため、ポリ乳酸のファイバーやメッシュよりなるチューブを使った研究は数多いが、生理活性分子をチューブ内腔へ安定に修飾する技術がないために、コラーゲンなどの動物由来タンパク質で神経再生性が補われているのが現状である。乳酸にはL体とD体の2つの光学異性体が存在し、それらのポリマーを混合すると安定なステレオコンプレックスを形成することが知られている。我々は、オリゴD-乳酸/ペプチド複合体とポリL-乳酸とのステレオコンプレックス形成を利用したポリ乳酸スキャホルドへのペプチド固定化法を考案した<sup>11,12</sup>。この方法は、オリゴD-乳酸/ペプチド複合体とポリL-乳酸とを混合し、急速に脱溶媒することによって均一なステレオコンプレックスを形成させることで、ポリ乳酸スキャホルド上にペプチドを固定化するものである(図3)。前節と同様に神経再生性ペプチドにはAG73を選択し、本方法によるポリ乳酸スキャホルドへの固定化を検討した。まず、Fmoc固相合成法でAG73を逐次伸長後、あらかじめ脱水縮合によって合成したオリゴD-乳酸(分子量700~1750Da)を樹脂上で縮合させることでオリゴD-乳酸/AG73複合体を得た。ポリL-乳酸とオリゴD-乳酸/AG73複合体を質量比97:3で混合して10%ヘキサフルオロイソプロパノール溶液とし、スピニング法で薄膜を成型した。また、同溶液を電解紡糸(エレクトロスピンニング)することによってナノファイバー不織布も作製した。それらの上にPC12細胞を播種し、接着性および神経突起伸長活性を評価した。その結果、未修飾のポリL-乳酸と比較して、オリゴD-乳酸/AG73複合体を混合させることによってPC12細胞の接着および突起伸長が向上した(図4)。前節の物理吸着を利用した方法と比較しても、

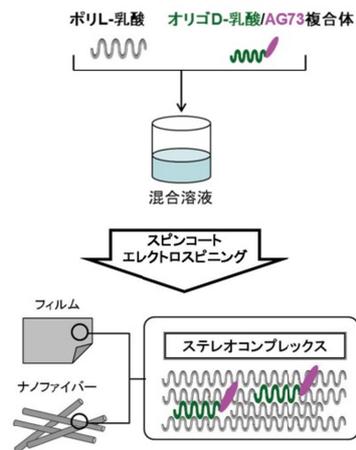


図3 ステレオコンプレックス形成を利用したポリ乳酸へのペプチドの固定

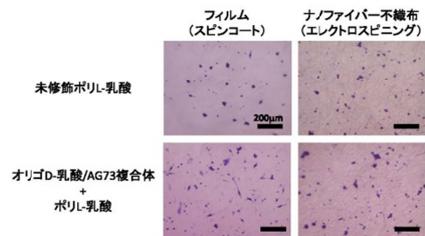


図4 オリゴD-乳酸/AG73複合体を混合成型したポリ乳酸フィルムおよびナノファイバー不織布上でのPC12細胞の接着挙動<sup>12</sup>

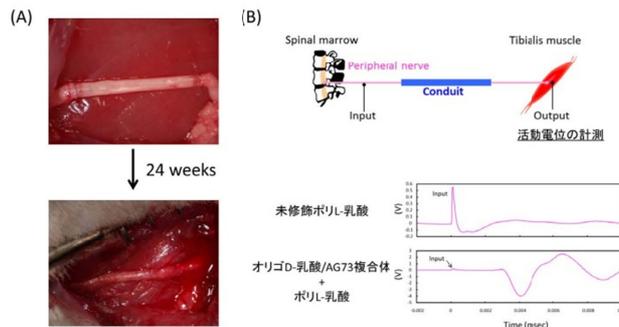


図5 オリゴD-乳酸/AG73複合体ナノファイバー神経誘導チューブのラット坐骨神経欠損部への移植<sup>12</sup>  
 (A) ラット坐骨神経欠損部に移植したチューブ [移植直後と24週後]  
 (B) 移植24週後の活動電位測定

その差は明確であり、安定かつ充分量のペプチドが導入されていることが推察された。さらに、電解紡糸によってオリゴD-乳酸/AG73複合体とポリL-乳酸とを混合したナノファイバーを内層とした神経誘導チューブを作製し、ラットの坐骨神経に作製した10mmの神経欠損を架橋して24週後に神経再生を組織学的および電気生理学的に評価した(図5(A))。その結果、誘導チューブは生体内で分解されており、その内部にGFAP (glial fibrillary acidic protein) およびニューロフィラメント陽性神経組織の再生が認められた。また、電気生理学的な評価でも、誘導チューブ移植部中枢側からの電氣的刺激によって脛骨筋電位が検出され、機能神経が再生していることも明らかとした(図5(B))。このオリゴD-乳酸/ペプチド複合体を用いたポリL-乳酸の機能化は、末梢神経再生誘導チューブのみならず、動物由来材料フリーの新しい医療用デバイス開発への展開が期待される。

#### おわりに

本稿では、バイオマテリアルおよび組織工学の概説と、バイオアクティブバイオマテリアル開発におけるペプチドの利用例として、ポリ乳酸スキャホールドへのペプチド修飾法に関する筆者らの2つのアプローチを紹介させて頂いた。我々は、コラーゲン様ペプチド (PPG)<sub>6</sub> の物理吸着およびオリゴD-乳酸/ペプチド複合体のステレオコンプレックス形成を利用することで、極めて簡便にポリ乳酸スキャホールドをペプチドで修飾することに成功した。また、オリゴD-乳酸/AG73複合体とポリL-乳酸よりなるナノファイバー神経再生誘導チューブにおいては、ラット坐骨神経欠損モデルを用いた*in vivo* 試験でその有用性を明らかとした。

ペプチドがバイオマテリアルの機能化に有用であること示す報告は極めて多いものの、大部分は*in vitro* の評価に留まっており、実際にデバイスとして臨床利用されるに至った例はない。その理由の一つに、生体安全性、簡便性(操作性)や基材選択性など、臨床利用に必要な特性を備えたペプチド固定化法が少ない事

が挙げられる。我々は、マテリアルの研究者としてそれぞれの基材およびデバイスに適したペプチド固定化法を提供することで、ペプチドのバイオマテリアル開発への展開をよりスムーズにし、組織工学の実現ならび新規医療用デバイスの臨床応用へと発展するための一助となることができればと考えている。

ここに紹介させて頂いた研究は、(独)国立循環器病研究センター研究所生体医工学部の山岡哲二郎長をはじめ、多くの共同研究者の方々の御指導ならび御支援によるものであり、ここに深く御礼申し上げます。また、末筆にて恐縮ながら、本PEPTIDE NEWSLETTER JAPANにてバイオマテリアルという少し異分野でのペプチドの有用性について紹介させて頂ける機会を賜わり、近畿大学理工学部生命科学科 日高雄二先生をはじめ、編集委員の先生方に深く御礼申し上げます。

#### 参考文献

1. Langer, R. et al., Science 260, 920-926 (1993)
2. Cao, Y. et al., Plast. Reconstr. Surg. 100, 297-302 (1997)
3. Hubbell, JA. Cur. Opi. Biotechnol. 10, 123-129 (1999)
4. Brandley BK. et al., Develop. Biol. 135, 74-86 (1989)
5. Urry, DW. et al., J. Protein Chem. 3, 403-436 (1984)
6. Creel, HS. et al., Macromolecules 24, 1213-1214 (1991)
7. Kisiday, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 9996-10001 (2002)
8. Yamaoka, T. et al., Koubunshi Ronbunshu 55, 328-333 (1998)
9. Kakinoki, S. et al., Acta Biomaterialia 6, 1925-1930 (2010)
10. Weeks, BS. et al., Exp. Cell Res. 243, 375-382 (1998)
11. Yamaoka, T. et al., In Proceedings of International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, HI, USA, 15-20 December 2005; Program No. 482.
12. Kakinoki, S. et al., Polymers 3, 820-832 (2011)

かきのき さちろう  
 (独) 国立循環器病研究センター  
 研究所生体医工学部  
 sachiro@ncvc.go.jp