

201419090B

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～26年度 総合研究報告書

研究代表者 柿木 佐知朗

平成27（2015）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～26年度 総合研究報告書

研究代表者 柿木 佐知朗

平成27（2015）年 5月

別添 2

目 次

I. 総合研究報告書（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.....	4
C. 研究結果.....	9
D. 考察.....	15
E. 結論.....	18
F. 健康危険情報.....	20
G. 研究発表.....	20
H. 知的財産権の出願・登録情報.....	22
II. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添 4）	70
III. 研究成果の刊行物の別刷	72

別添 3

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
総合研究報告書

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、生体組織再生に適切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した。

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、これまでは腓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5 cm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ンジでの体内への注入が容易である。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し、かつ分化を制御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ンからのラミニン-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; AG-VP)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、AG-VP/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、AG-VP/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2mm)を作製し、ウサギ脛骨神経に作製した2cm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、AG-VP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、平成25年度はAG-VP/ポリ乳酸混合マイクロファイバー神経誘導管の内径を2mmから3mm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、AG-VP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、前年度と同じくAG-VP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、AG-VPはPC12細胞に対しては突起伸長活性を示したものの、*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生合成に着手した。平成25年度中に、エラスチン様繰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。

平成26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、突起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、ファイバーを神経の軸索と平行に配向にすることで、再生神経の軸索伸長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. 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)₃₀-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) -ポリ乳酸混合マイクロファイバー不織布の作製

まず、ファイバーの作製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) との混合マイクロ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、エレクトロスピンング法を用いてマイクロファイバー不織布を作製した。エレクトロスピンングの条件は、印加電圧を ±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-乳酸混合マイクロ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マイクロ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-乳酸マイクロファイバー不織布、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-乳酸に混合したマイクロファイバー不織布も作製した。それぞれのマイクロ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) -ポリ乳酸複合マイクロ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 μ g/mL)、Insulin (4 μ g/mL)、Progesterone (20nM)、Na₂SeO₃ (30nM)、NGF (100ng/mL)) に細胞を分散し、通常の TCPS 上に播種し、37°C の CO₂ 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-乳酸混合マイクロファイバー不織布を 12 × 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 × 10⁴ cell/ml/well となるように播種し、CO₂ 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) -ポリ乳酸混合マイクロ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-乳酸混合マイクロ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(φ2.0 mm)をターゲットとし、AG-VPとポリL-乳酸を混合させたマイクロ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。作製されたマイクロ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)-ポリ乳酸混合マイクロ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-乳酸混合マイクロファイバーチューブ(内径:2 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。

内径2 mmのチューブを2ヵ月間移植した際の神経組織のチューブ外への増殖を阻止するため、内径3 mmのチューブも同様の方法で作製しウサギ腓骨神経(2 cm欠損)に移植した。この際、再生神経の成熟を評価するために移植期間を3ヶ月とした。

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

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 サイトに上述の DNA 配列を挿入した。この pUC57((VP GIG)₆₀) (pUC57(VP)) 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(VP) 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 サイトにサブクローニングした。得られた pET19b(VP) をタンパク質発現用のコンピテントセル (RosettaTM(DE3) p LysS, 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。

続いて、得られた VP 発現用ベクター (pET19b(VP)) へのラミニン α 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(VP) には 2 つの (V P G I G)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 の挿入を検討した。pET19b(VP) 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; TOYOBO) 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 (γ 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(VP) 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 ($\lambda=260\text{nm}$) で定量し、所定量の DNA を使用して DH5 α 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 (アンピシリンを含む) 上に播種した。およそ 24 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 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™(DE3) p LysS, Novagen) 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-V P)) を得た。Rosetta™(DE3) p LysS (IK-VP) 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 Express™ Autoinduction System (Merck 社製) を含む 500 mL 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、IK-VP 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 (1000 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 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°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、凍結乾燥した。

7. 神経再生性人工細胞外マトリクス (IK-VP) とポリ乳酸を混合した配向性マイクロファイバーの作製

マイクロファイバーは、前述と同様エレクトロスピンニング法で作製した。まず、ポリ L-乳酸 (Mw=106000; 武蔵野化学研究所) 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 ~ 1250 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% (それぞれは 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ンングすることで、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。

8. 神経再生性人工細胞外マトリクス (IK-VP) とポリ乳酸を混合した配向性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、SingleQuots™を添加した PNGM™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で観察した。

C. 研究結果

1. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) の生合成

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) -ポリ乳酸混合マイクロ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-乳酸混合マイクロ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。それぞれのマイクロ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の条件で作製したマイクロ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ペプチドを混合させたマイクロファイバーと比較すると、AG-VP-ポリL-乳酸混合マイクロファイバーの径が最も細くなった。エレクトロスピンングで紡糸さ

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、それぞれのマイクロ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-乳酸混合マイクロ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-乳酸混合マイクロ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-乳酸混合マイクロ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-乳酸混合マイクロファイバーでは長期間安定に保持されると考えられる。

3. 神経再生性人工細胞外マトリクス (AG-VP) -ポリ乳酸混合マイクロ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

各マイクロ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)。ところが、ポリL-乳酸のみのマイクロ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 μm以下)を有する細胞が存在しなかった。しかし、AG73ペプチドを混合させたものでは、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 μ m以上)が見られた。これらと比較して、AG-VPを混合したマイクロファイバー上では、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-乳酸に安定に混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) -ポリ乳酸混合マイクロファイバーチューブの作製

作製した各マイクロ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-乳酸混合マイクロファイバーチューブのファイバー径は、内層で約800nm、外層が約1.9 μ 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-乳酸混合マイクロ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) -ポリ乳酸混合マイクロ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

作製した各マイクロファイバーチ

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2.0cm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。一方、マイクロファイバーチューブを移植した各群では、周辺組織の癒着も軽微で、容易に露出させることができた。チューブの内径が細かったためか、部分的に神経様組織がチューブ外部へ増殖している様子も見受けられた。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-乳酸複合マイクロ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マイクロ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。

内径3mmのチューブ(図16)の場合、移植3ヵ月後で周辺組織の癒着も縫合部での神経様組織の外部増殖も認められなかった。活動電位を測定したところ、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0.17msec、平均強度は0.35mVであった(図17-18、表4)。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

ープでは、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/AG-VP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。

2カ月および3ヶ月の移植実験の結果、いずれにおいてもAG-VP-ポリL乳酸複合マイクロファイバーチューブ内部において神経再生は僅かに亢進されたのみで、顕著な促進は認められなかった。

6. 新規人工細胞外マトリクス(IK-VP)の生合成

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19)。pUC57のマルチクローニングサイトに存在するEcoRIとHindIIIサイトに上述のDNA配列を挿入(pUC57(VP))し、それを導入したDH5 α 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2487 bp付近にバンドが確認され、理論値と一致した(図20)。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21)。

さらに、pUC57(VP)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サイトにサブクローニングした(pET19b(VP))。pET19b(VP)で形質転換したRosettaTM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5665 bp付近にバンドが確認され、理論値と一致した(図22)。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23)。

VPを500 mL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、VPに帰属される29.6 kDaのバンドが確認された(図24)。

続いて、pET19b(VP)へのIKVAV配列をコードしたDNAの挿入を検討した(図25)。まず、pET19b(VP)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26)。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27)。相補DNAの混合溶液とそのアニール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ルを要しないことが分かった。その後、NdeIで切断されたpET19b(VP)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 α)を形質転換した。寒天培地(アンピシリンを含む)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5mLのSOC培地(アンピシリン含む)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(VP)が導入されていることが示唆された。本方法でのpET19b(VP)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(VP)へのIKVAVコードオリゴDNAの導入を外部業者へ委託した。

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28)。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29)。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30)。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。

7. 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±4.0kVとして円盤型ターゲットへ電界紡糸した(図31)。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32)。その配向は、印加電圧が±5.0kVではランダムであったが、±4.0kV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33)。

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34)。

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±5.0kV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35)。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36)。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った。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時間アニーリング後、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もアニーリングの効果は認められず、アニーリングしたもののファイバーの溶着と膨潤が認められた(図37)。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38)。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39)。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40)。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、引き続き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。

8. 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41)。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42)。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43)。

D. 考察

平成24年度に、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。

収量 (約 50 mg/1 L 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に難しいため、生体分解吸収性高分子材料であるポリ L-乳酸との混合化が適当と考え、AG-VP-ポリ乳酸複合マイクロ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。予備的に検討したエラスチン C を用いたポリ L-乳酸との混合電界紡糸 (エレクトロスピンニング) では、エラスチン C の組成比が 75 wt% と高濃度でも、ポリ L-乳酸と混合したマイクロファイバーは水に浸漬しても径が細くなるのみで溶解せず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た。ポリ L-乳酸 (Mw: 10 kDa) と AG-VP との質量比を 4:1 として作製したマイクロファイバーも、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マイクロ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-乳酸との複合マイクロ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-乳酸の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-乳酸マイクロ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僅かな向上が認められたこれは、神経再生が僅かに促進されたことを示唆している。しかし、AG-VP の添加効果は有意なものではなく、PC12 細胞を用いた *in vitro* 評価の結果からの想定とは大きく乖離していた。移植 2 か月後の外観観察で、縫合部での神経様組織のチューブ外での増殖が認められた。これは、チューブの内径が 2 mm では細いためと考え、内径が 3 mm のチューブを作製して移植した。その際、より再生した神経が成熟するであろう 3 ヶ月後に電気生理学的に評価した。内径を 2 mm から 3 mm 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。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。AG-VP を混合したポリ L-乳酸マイクロ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0.42mV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0.14msec、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/AG-VP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、AG-VP の生体内での末梢神経再生促進能は乏しく、より活性の高い人工細胞外マトリクスを設計する必要があると考えた。

そのため、平成25年度の後半からAG-VP と同じくエラスチン様繰り返し配列を構造骨格とする新たな人工細胞外マトリクスの生合成に着手した。まず、2つの(VPGIG)₃₀ブロックを制限酵素切断配列で連結した VP

(VPGIG)₆₀ の発現系を構築した。その際、大腸菌のレアコドンの発現に適している Rosetta™(DE3) p LysS 株を選択した。

平成26年度には、VP にラミニン由来神経突起伸長活性 IKVAV 配列を6つ導入した IK-VP の大腸菌発現システムを構築し、約120mg/1L培養の大量発現を実現できた。タンパク質1分子あたりの活性配列数が、AG-VP の6倍となり、より高い活性が期待される。

さらに、配向性の揃った IK-VP/ポリL-乳酸混合マイクロファイバーの作製を検討した。ウサギ脛骨神経へ移植したAG-VP/ポリL-乳酸混合マイクロファイバーは配向性がランダムであった。PC12細胞を用いた *in vitro* 評価で、突起はファイバーに沿って伸長している様子が見られた。つまり、ファイバーの配向を揃える（チューブの長軸側）ことで、神経軸索の伸長方向を制御できると考えた。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だが、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、平成24年及び25年度と同じく、ポリL-乳酸との混合系を採用した。VP と IK-VP 共に、ポリL-乳酸に混合させることで、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、