

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 以上になると直径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 PC12 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

初年度（平成25年度）は当初の予定に準じ、既存していた AG-VP の大量発現系を確立し、それとポリ L-乳酸との混合マイクロファイバーの作製を完了できた。この AG-VP/ポリ L-乳酸混合マイクロファイバーは、*in vitro* 評価において PC12 細胞の接着と突起伸長を有意に向上させたことから、*in vivo* 評価（動物実験）を進

めるべきと判断した。初年度のうちに、2年次に計画していた AG-VP/ポリ L-乳酸混合マイクロファイバーよりなる神経誘導チューブの作製とウサギ脛骨神経欠損部（2 cm）への移植に着手できた。その移植2カ月後の電気生理学的評価の結果、ポリ L-乳酸マイクロファイバーへの AG-VP の混合による末梢神経再生促進効果はごく僅かであった。外観所見において神経切断部とチューブとの吻合部で神経様組織のチューブ外部への増殖が見られたため、平成26年度はチューブ内径を2 mmから3 mmに拡張した。また、2カ月では神経の再生が完了していなかったことを踏まえて、移植期間を3ヶ月に延長した。その結果、神経様組織のチューブ外部への増殖を阻止することはできたものの、AG-VP の添加による顕著な神経再生の亢進は認められず、期待を反するものであった。この時点での結果から、AG-VP は *in vitro* 評価系では高い突起伸長活性を有しているものの、*in vivo* 評価系ではその末梢神経再生促進能が乏しいという結論に至った。また、当初計画していた中枢神経系への適応も、AG-VP の生理活性では期待するような効果を発揮できないであろうと判断した。

そこで、平成26年度後半からは、エラスチン様繰り返し配列を骨格とし、ラミニン由来の神経再生促進配列 IKVAV よりなる新たな人工細胞外マトリクス設計と生合成に着手した。そして、エラスチン様繰り返し骨格配

列((VPGIG)<sub>60</sub>;VP)に、6つのIKVAV配列を挿入したIK-VPの発現系を確立できた。初年度の経験を踏まえた発現条件の最適化によって、VPとIK-VP共に、100mg/1L培養を越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VPおよびIK-VPを充分量、継続的に確保できると考え、VPおよびIK-VPのみでなるマイクロファイバーの作製を検討した。いずれも電界紡糸(エレクトロスピンニング)によるマイクロファイバー化には成功したものの、PBSに浸漬した際の安定性が乏しかった。特に、神経誘導チューブとして使用する際は、神経の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、IK-VPのみでなるマイクロファイバーは適さないと判断した。そのため、AG-VPと同じく、ポリL-乳酸との混合化によるマイクロファイバーの安定性の向上を計った。同時に、末梢神経再生時における軸索伸長を加速させることを目的として、配向の揃ったマイクロファイバーの作製を検討した。その結果、VPもしくはIK-VPを混合したポリL-乳酸マイクロファイバーの配向化に成功し、かついずれのマイクロファイバーも、PBSに24時間浸漬させた際に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10μm程度のものとは違い、長いもので50μm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、我々が既成していたAG-VPの*in vivo*における末梢神経再生促進能力が乏しかったことをうけて、新たな人工タンパク質の設計と生合成に舵を振って研究を遂行した。最終年度に得たIK-VPの水溶液に4℃でPC12細胞を分散させた後、37℃で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。移植細胞をIK-VPの温度凝集性を利用して保護し、かつその神経細胞への分化もしくは軸索伸長の促進が可能となるような新しい移植補助担体としての有用性が期待される。また、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、生体安全性に優れた細胞移植用担体になりうる。

細胞移植用担体（補助材）としての有用性の検証には至らなかったことは、研究計画の不充分さを反省すべき点である。しかし、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（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, Thre

e-layer microfibrillar 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

- 1) 山岡哲二、柿木佐知朗：再生医療のための繊維材料修飾とその評価、繊維と工業、68(11): 314-318, 2012.
- 2) 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）(2013)p35-40.
- 3) 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、山岡哲二、ポリ乳酸／人工細胞外マトリクス複合型機能性神経誘導管を用いた末梢神経再生、第11回日本再生医療学会総会（2012年6月13日、横浜）[国内学会、口頭発表]

- 2) 柿木佐知朗、山岡哲二、人工ペプチド・人工タンパク質を用いたポリ乳酸スキャホールドの機能化と末梢神経再生医療への応用、第61回高分子討論会（2012年9月21日、名古屋）[国内学会、口頭発表]
- 3) 柿木佐知朗、中山みどり、森反俊幸、山岡哲二、神経疾患治療用担体を志向したエラスチン様人工タンパク質の機能評価、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012（2012年11月27日、仙台）[国内学会、ポスター発表]
- 4) 中山みどり、柿木佐知朗、森反俊幸、山岡哲二、ラミニン/エラスチン模倣人工細胞外マトリクスとポリ乳酸を複合化したマイクロファイバーの神経誘導管への応用、第12回日本再生医療学会総会（2012年3月22日、横浜）[国内学会、ポスター発表]
- 5) 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マイクロ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]
- 6) Sachiro Kakinoki, Midori Nakayama, Toshiyuki Moritan, Tetsuji Yamaoka, Nano-fibrous conduit composed of elastin-laminin mimicking artificial protein and poly (L-lactic acid) for peripheral nerve regeneration, Advanced Materials World Congress (September 16-19, 2013, Izmir, Turkey) [国際学会、ポスター発表]
- 7) 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]
- 8) 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マイクロ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]

9) 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マイクロファイバーを用いた末梢神経再生、平成 26 年度繊維学会年次大会 (2014 年 6 月 11-13 日、船堀) [国内学会、口頭発表]

外マトリクス混合ポリ乳酸ファイバーよりな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]

10) 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よりな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]

11) 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]

12) 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

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

該当なし

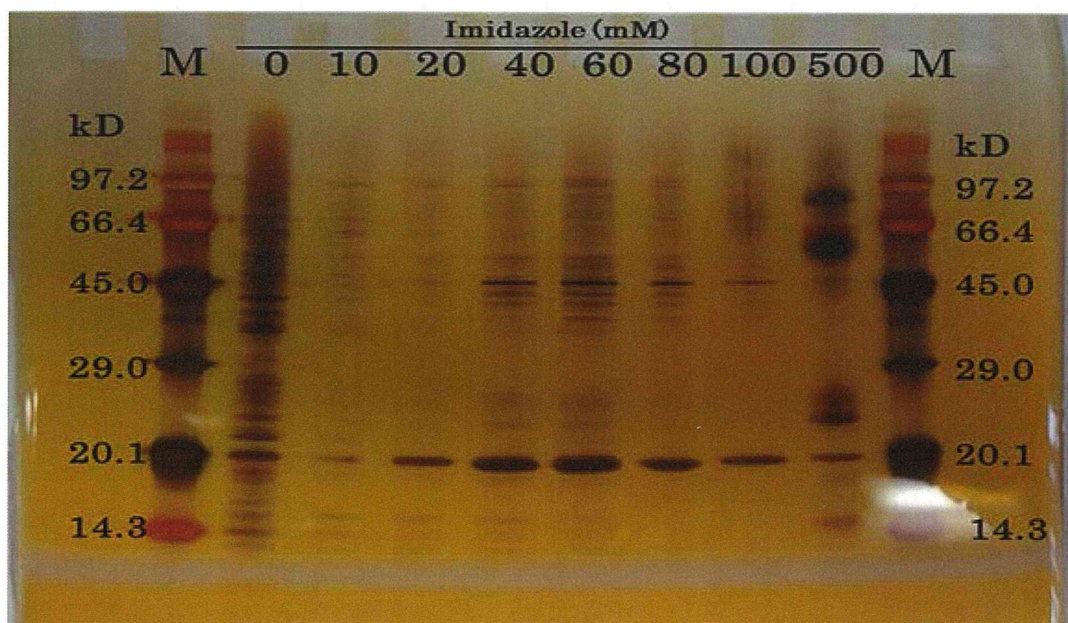


図1. 様々なイミダゾール濃度のリン酸緩衝溶液を用いて His タグアフィニティカラムから溶出させた AG-VP の SDS-PAGE

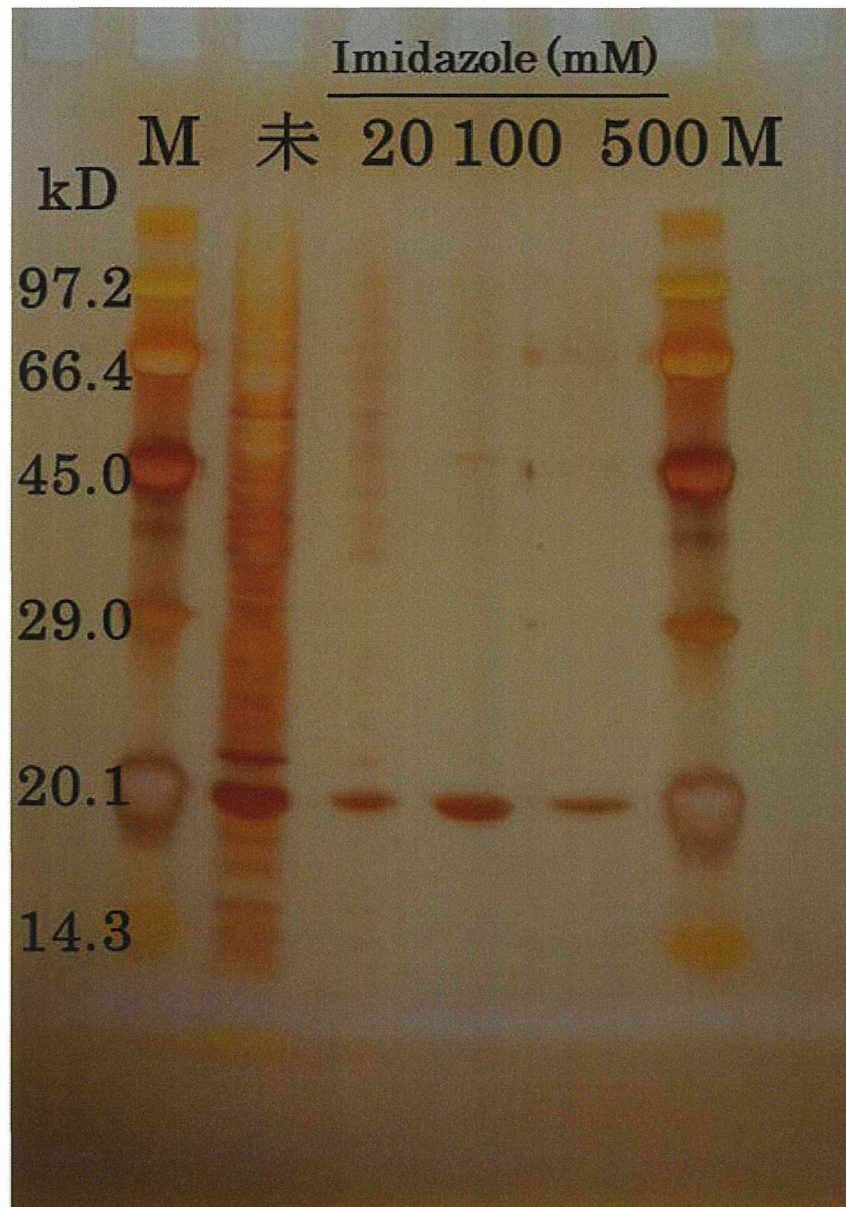


図2. 最適化した条件で精製したAG-VPのSDS-PAGE

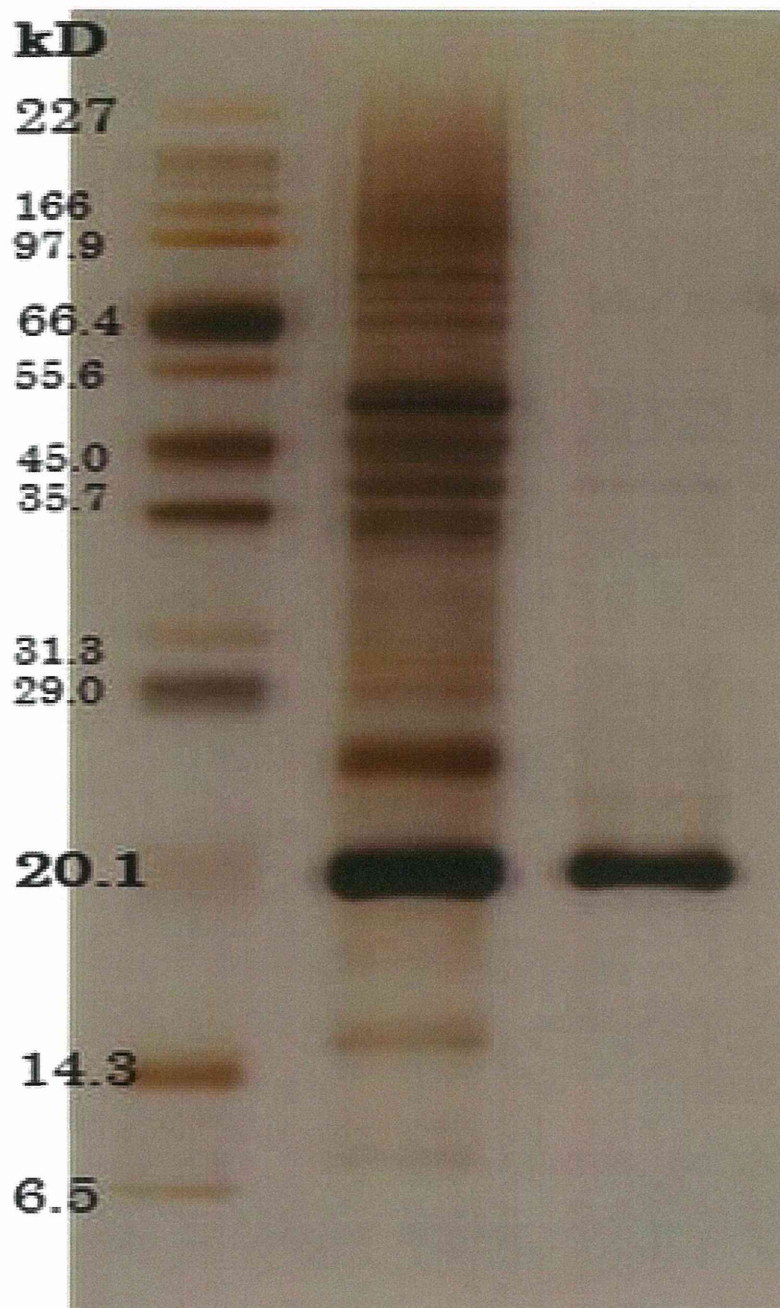
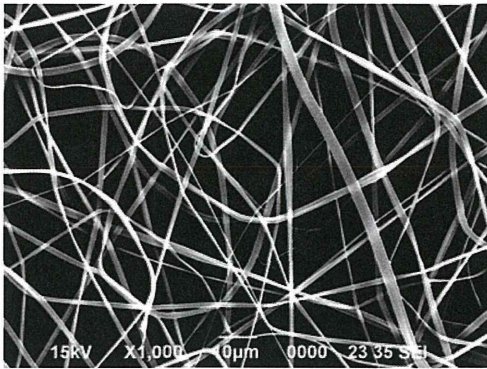


図3. 限外濾過後に得た高純度 AG-VP の SDS-PAGE

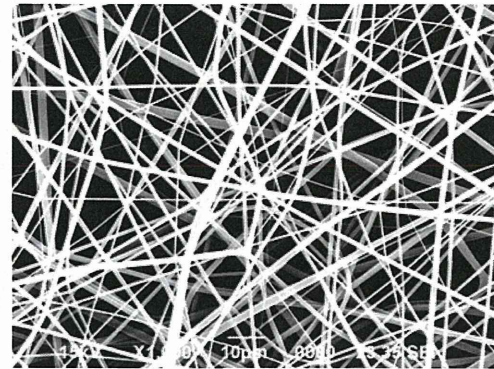


# Elastin-C / ポリL-乳酸

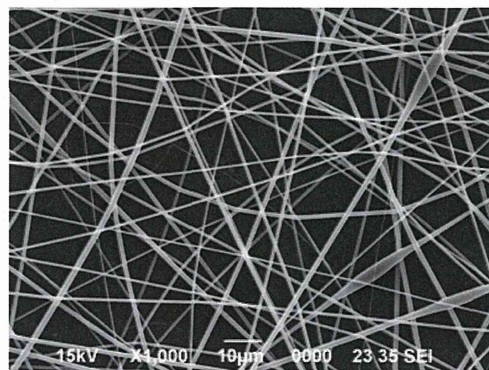
100/0



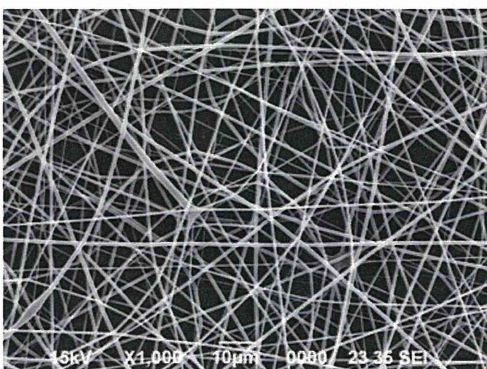
75/25



50/50



25/75



0/100

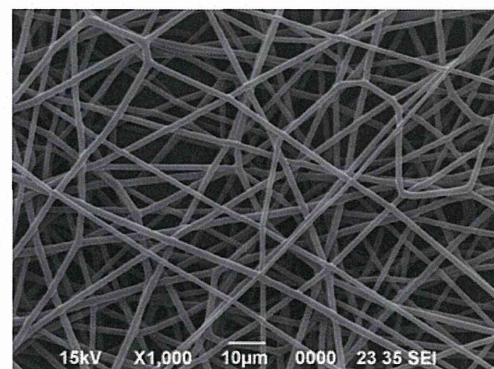


図4. 様々な組成で電界紡糸したエラスチンC-ポリL-乳酸複合マイクロファイバーの走査型電子顕微鏡像

表 1. 様々な組成で電界紡糸したエラスチン C-ポリ L-乳酸複合マイクロファイバーのファイバー径

| Elastin-C / ポリL-乳酸 (w/w) | ファイバー径 ( $\mu\text{m}$ ) |
|--------------------------|--------------------------|
| 100 / 1                  | 1.29 $\pm$ 0.67          |
| 75 / 25                  | 1.36 $\pm$ 0.49          |
| 50 / 50                  | 0.88 $\pm$ 0.36          |
| 25 / 75                  | 0.92 $\pm$ 0.29          |
| 0 / 100                  | 1.83 $\pm$ 0.26          |

## Elastin-C / ポリL-乳酸

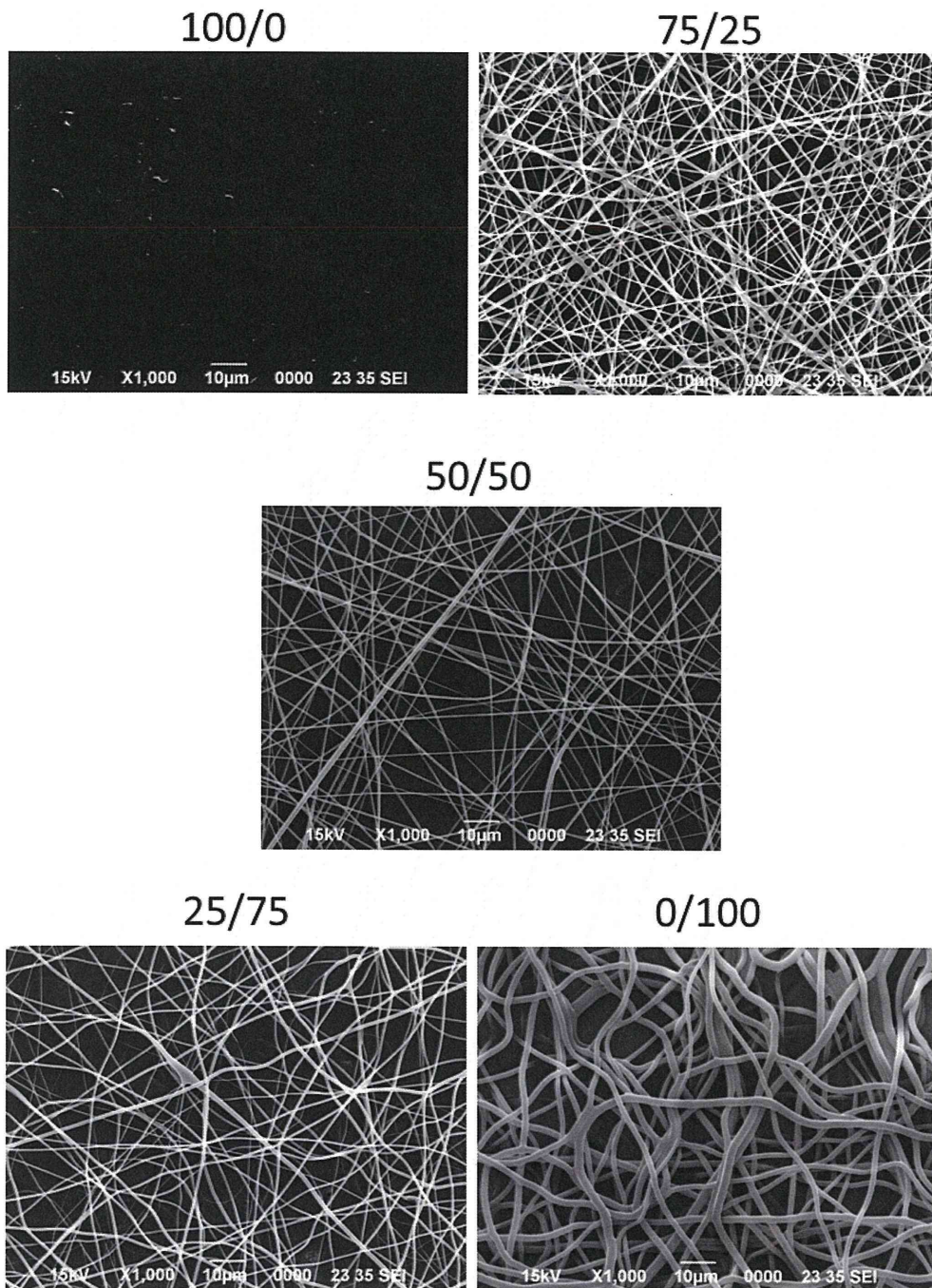


図5. 様々な組成で電界紡糸したエラスチン C—ポリ L-乳酸複合マイクロファイバーの浸水後の走査型電子顕微鏡像

表 2. 様々な組成で電界紡糸したエラスチン C—ポリ L-乳酸複合マイクロファイバーの水浸後のファイバー径

| Elastin-C / ポリL-乳酸 (w/w) | ファイバー径 ( $\mu\text{m}$ ) |
|--------------------------|--------------------------|
| 100 / 1                  | -                        |
| 75 / 25                  | $0.79 \pm 0.29$          |
| 50 / 50                  | $0.67 \pm 0.17$          |
| 25 / 75                  | $0.75 \pm 0.28$          |
| 0 / 100                  | $1.87 \pm 0.53$          |

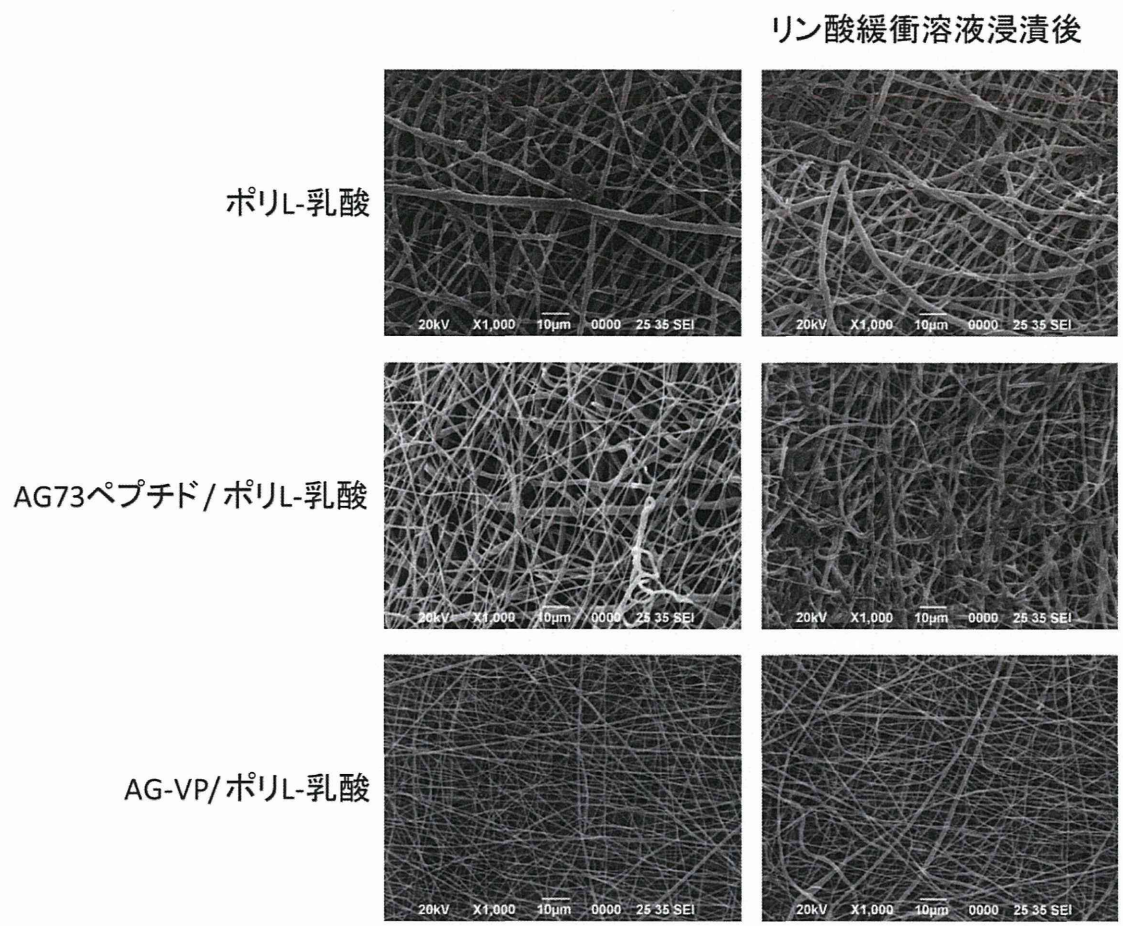
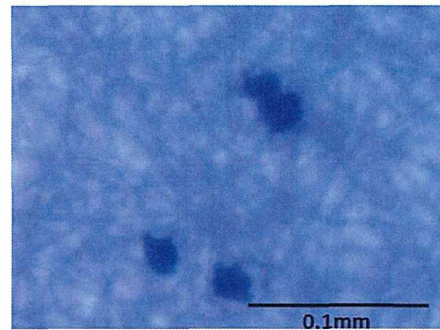
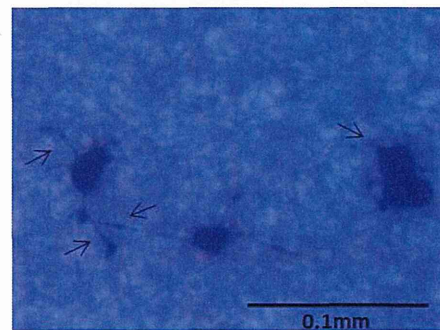


図6. リン酸緩衝溶液への浸漬前後のAG-VP-ポリL-乳酸複合マイクロファイバー不織布の走査型電子顕微鏡像

ポリ-L-乳酸



AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸



AG-VP/ポリ-L-乳酸

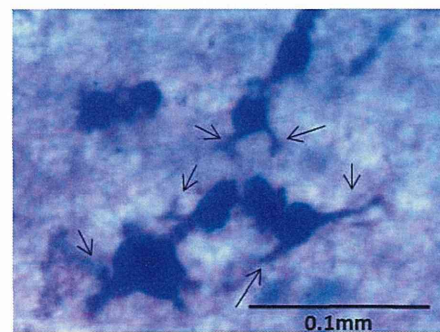


図7. 各マイクロファイバー不織布上での PC12 細胞の接着と神経突起伸長

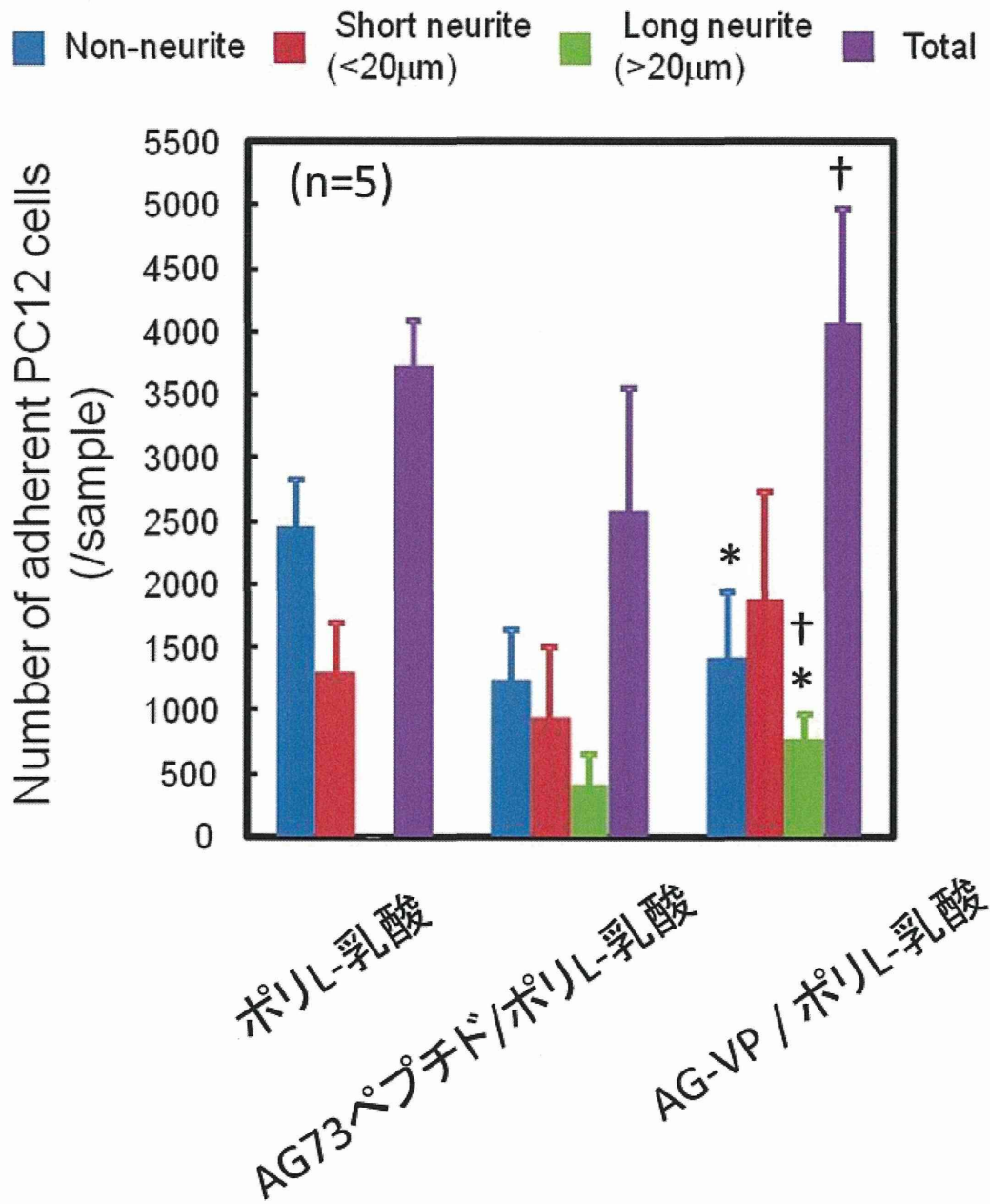
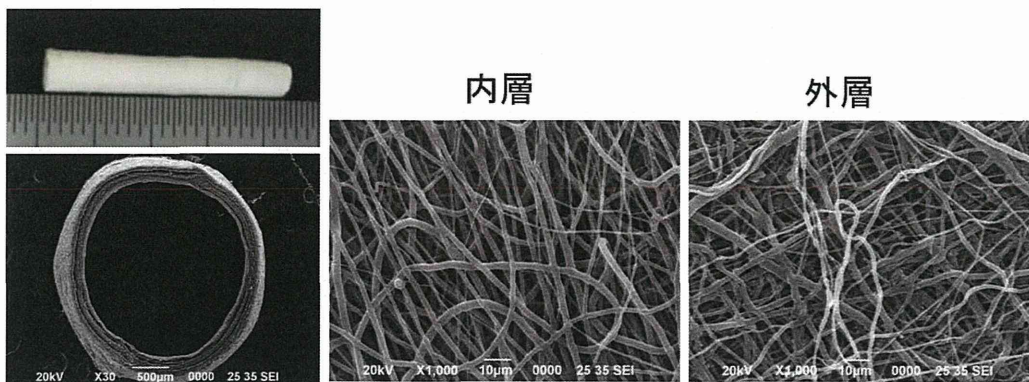
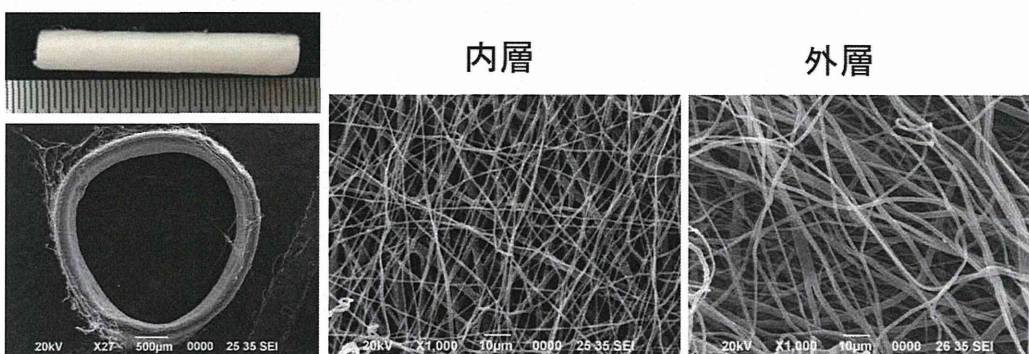


図8. 各マイクロファイバー不織布上でのPC12細胞の接着数と神経突起伸長の定量 (\* p < 0.05 vs. ポリ-L-乳酸、† p < 0.05 vs. AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸)

### ポリ-L-乳酸



### AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸



### AG-VP/ポリ-L-乳酸

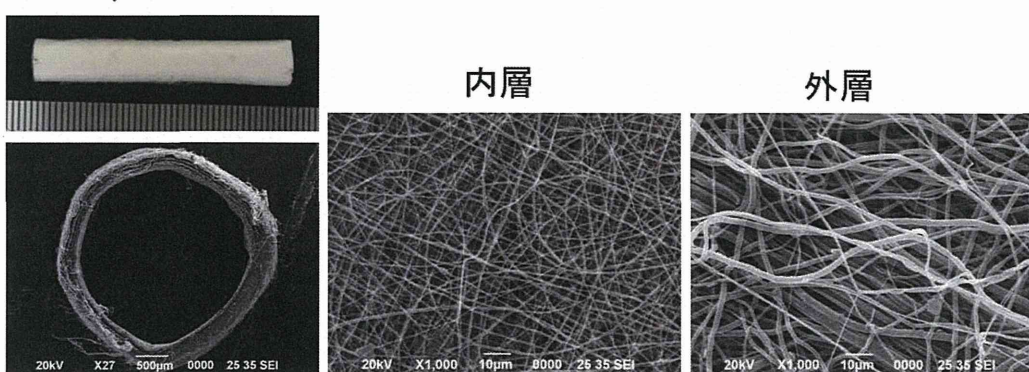
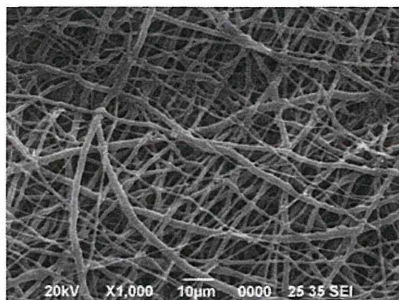


図9. 各マイクロファイバークューブ（内径2 mm）の外観と電子顕微鏡像

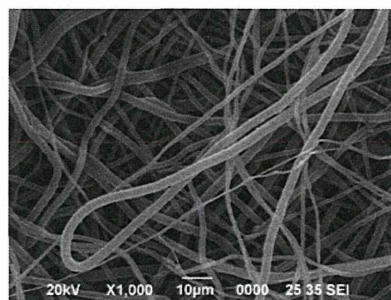


## ポリ-L-乳酸

内層

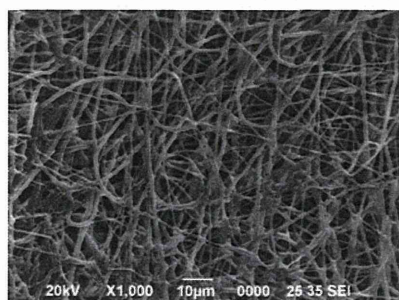


外層

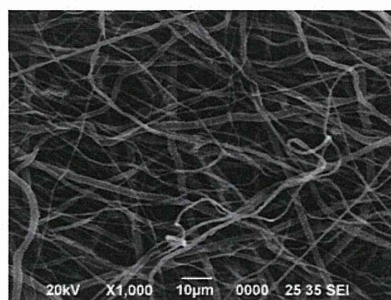


## AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸

内層

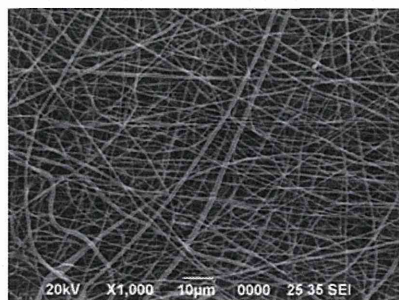


外層



## AG-VP/ポリ-L-乳酸

内層



外層

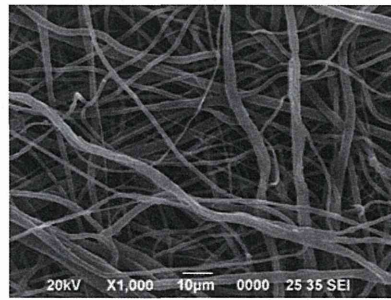


図10. 各マイクロファイバークューブのリン酸緩衝溶液浸漬後の電子顕微鏡像

Proximal

Distal

露出した坐骨神経



剥離された脛骨神経

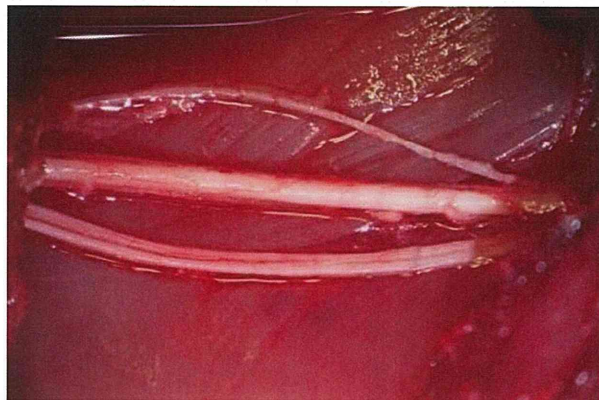


図 1 1. 露出した坐骨神経と剥離して分離した脛骨神経  
(下図、上から腓骨神経、脛骨神経、腓腹神経)

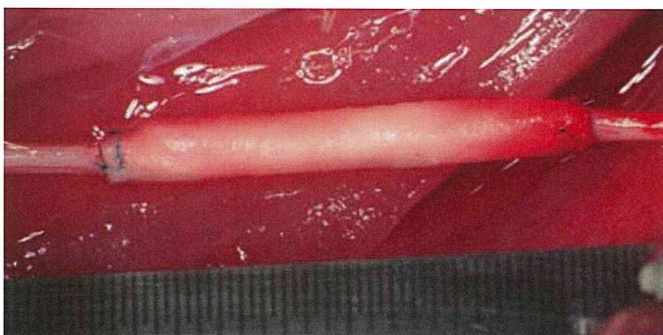
## ポリ-L-乳酸



## AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸



## AG-VP/ポリ-L-乳酸



Proximal

Distal

図1 2. ウサギ脛骨神経の欠損部（2 cm）に移植した各マイクロファイバーチューブ

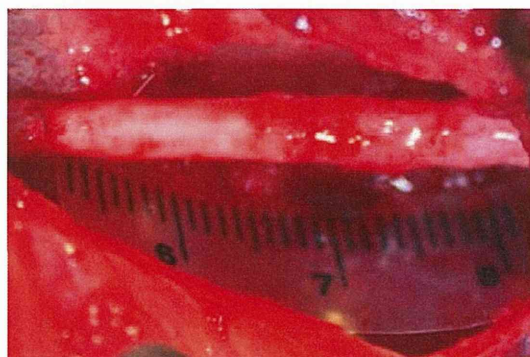
## ポリ-L-乳酸



## AG73ペプチド/ポリ-L-乳酸



## AG-VP/ポリ-L-乳酸



Proximal

Distal

図13. 移植2カ月後に露出させた各マイクロファイバークューブ