

はずであるが、いずれも可能性に過ぎないことを強調させて頂きたい。例えば、「再生(速度)と同調した分解(速度)」と書くのは簡単であるが、同調させるべき組織再生(速度)が明らかでないために、いろんなファイバー材料の分解速度を議論しても、それが、再生医療を推し進めてくれる可能性は低い。定量的なロジックが組み立てられない現状では速度の異なるナノファイバーで実際の組織再生性を比較することが最も早道かも知れない。

もちろん、ナノファイバーの最も注目されるべき特徴は構造的特性であり、三次元的構造体としての高強度性(形状安定性)もきわめて重要である。ナノファイバーは、破断強度は高くても曲げや変形には柔軟であるために、その三次元構造体は一般的に外力によって圧縮されやすく、たとえば皮膚組織再生においては創部のれん縮につながる。また、スキャホールドに幹細胞を培養するだけでもスキャホールドは収縮する<sup>14)</sup>。

繊維の直径が細胞との相互作用に大きく影響することも古くから知られている<sup>15)</sup>。小林らは4、10、500nmの電界紡糸ファイバーを利用して単一細胞との相互作用について詳細に検討している<sup>16)</sup>。ファイバー構造に対する細胞の接着性は高く、また、その挙動も極めて興味深い。ここで、繊維間隙のサイズや連通性は、細胞や組織の浸潤、組織反応を大きく左右するパラメー

ターとしてきわめて重要である<sup>17,20)</sup>。細胞の大きさは10~数十μmであり、細胞が浸潤しやすい孔径は100~200μmとされている。一般的には、繊維径が小さい方が、細胞が良く接着し増殖すると云われるが、たとえば直径0.1μmのナノファイバーで作成したナノファイバー多孔質不織布の孔径は、細胞や組織が浸潤できる大きさではない。その孔径を100μm程度にするには全く新たな紡糸法が必要である。

我々の研究グループでは、図1に示したようなポリ乳酸系ファイバー(直径1μm以下になると構造体としての力学強度が下がったために、数μmを選択した)からなる人工血管の研究を進めていた。外層はポリ乳酸繊維で作成し自己組織化誘導を目指し、内層は抗血栓性を上昇させるために親水性のポリ乳酸誘導体を用い、ラット腹部やイヌ頸動脈を用いた評価を進めていた。外層の組織再生性は狙い通

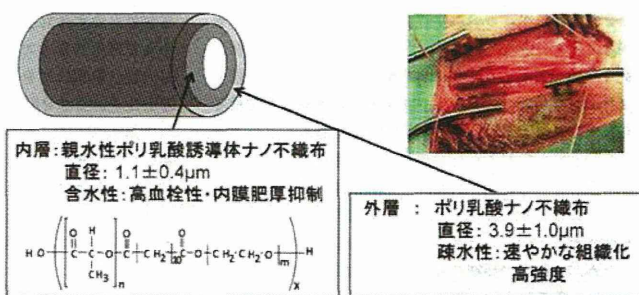


図1 二重構造再生型人工血管とイヌ頸動脈置換モデル

表2 バイオマテリアルとして研究されているナノファイバー

Material	Solvent	Fiber diameter (nm)	Objective	Reference	
Synthetic	Poly (ε-caprolactone)	Chloroform	200 - 600	Bone regeneration	[21]
	Poly(L-lactid-co-ε-caprolactone)	Acetone	400-700	Scaffold	[22]
	Poly (L-lactide)	HFP <sup>1)</sup>	1000	Scaffold	[23]
	Poly (lactide-co-glycolide)	HFP <sup>2)</sup>	200-500	Scaffold	[24]
	Polyhydroxyalkanoate	HFP <sup>3)</sup>	100-700	Scaffold	[25]
Natural	Collagen	HFP <sup>4)</sup>	500-600	Vascular graft	[26]
	Elastin	Water	100-800	Scaffold	[27]
	Gelatin	HFP <sup>5)</sup>	80-700	Scaffold	[28]
	Fibrinogen	Formic acid	30-120	Wound dressing	[29]
	Silk fibroin	HFP <sup>6)</sup>	100-200	Nerve regeneration	[30]
	Laminin	Formic acid	80-650	Homogenous fiber	[31]
	Chitosan	Water/FA <sup>7)</sup> /DMF <sup>8)</sup>	30-50	Scaffold	[32]
	Hyaluronic acid	HFP <sup>9)</sup>	800-1700	Vascular graft	[33]
	Poly (lactide-co-glycolide)/Gelatin/Elastin	HFP <sup>10)</sup>	300-1200	Vascular graft	[34]
	Poly (ε-caprolactone)/Collagen/Elastin	HFP <sup>11)</sup>	500-1600	Vascular graft	[35]
Blend	Poly (ε-caprolactone)/CaCO <sub>3</sub>	Chloroform/Methanol	500-1500	Bone regeneration	[36]
	Gelatin/hydroxyapatite	HFP <sup>12)</sup>	200-400	Guided tissue regeneration	[37]
	Keratin/poly(ethylene oxide)	TFE <sup>13)</sup>	200-2000	Wound dressing	[38]

<sup>1)</sup>HFP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol  
<sup>2)</sup>FA: Formic acid  
<sup>3)</sup>DMF: N,N-dimethylformamide  
<sup>4)</sup>TFE: 2,2,2-trifluoroethanol

りの効果を示したが、内層に関しての問題点が明らかとなった。まず、抗血栓性をあげるための親水性は、類似のメカニズムにより内皮化をも遅延させ、結果、再生型血管としては必ずしも優位ではない。また、繊維状構造は、細胞接着性に優れるのと同様のメカニズムによって、血小板粘着を亢進させ、抗血栓性を劣勢にする。もちろん、偽内膜形成を狙った人工血管が存在するが、これは中・大口径においてのみ有効であり、小口径血管に対しては内腔面に露出する繊維構造は望ましくないと、我々は考えている。このように、繊維構造は、生体に大きな影響を有するが、ターゲットを上手く選択する必要がある。

#### 4. さまざまな素材によるナノファイバー研究

合成高分子、天然高分子、およびそれらのブレンドなどを基材としたエレクトロスピニングによって、様々なナノファイバーが作製されている(表2)。合成高分子としては、すでに骨固定材や外科用縫合糸として臨床で用いられている生体分解吸収性高分子であるポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリε-カプロラクタム(PCL)およびそれらの共重合体がナノファイバーの基材として広く利用されている<sup>21,22)</sup>。これらは生体内で乳酸もしくはグリコール酸に加水分解され、最終的に乳酸回路もしくはクエン酸回路を介して代謝される。その分解速度は、分子量や共重合組成比、ファイバー径などによって容易に制御することができ、一般的には数カ月～数年で完全に分解される。そのため、生体内で長期の安定性が求められる人工血管、人工神経、瘻管防止膜やドラッグデリバリー用担体などに有用である。その他にも、微生物由来のポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)なども用いられている<sup>23)</sup>。これらは生体分解吸収性・安全性に優れているものの、細胞接着性などの生物学的な特性を有していないため、組織工学用スキャホールドとして用いるためには何らかの生理活性分子を修飾もしくは複合する必要がある。

生体内の細胞はECMで構成される微細構造を足場としていることから、ECMタンパク質よりなるナノファイバーはスキャホールドに最適であろうと考えられる。その中でも、ECMの骨格タンパク質であるコラーゲン、エラスチンおよびゼラチンよりなるナノファイバーは、人工血管への応用を目的として活発に研究されてきた<sup>25,26)</sup>。これらのECMタンパク質中には、細胞接着性や血管新生性を示す様々な生理活性配列が存在する。例えば、エラスチンの場合、血管内皮細胞の遊走や平滑筋細胞の接着を促進し、かつ血小板の粘着を抑制することが知られている。そのため、エラスチンを基材としたナノファイバーは、血管内皮細胞との高い親和性と抗血栓性を兼ね備えた人工血管として望ましい特性を示すとされているが、上述したような機能のみの評価では不十分であり、抗血栓性を含めた他の要因に関する評価も同時に必要である。その上、これら骨格タンパク質は生体組織の伸縮性、弾性、剛性を担っており、得られるナノファイバーも優れた力学的特性が期

待できる。他にも、血中に存在するフィブリノゲン<sup>27)</sup>、古くより外科用縫合糸として用いられてきたシルクフィブロイン<sup>28)</sup>、さらに基底膜構成タンパク質であるラミニン<sup>29)</sup>などを基材としたナノファイバーも作製されており、人工神経など幅広い応用が期待されている。タンパク質以外にも、キトサン<sup>30)</sup>やヒアルロン酸<sup>31)</sup>などの天然多糖を基材としたナノファイバーも作製されている。天然高分子を基材としたナノファイバーは、生体親和性や生理活性に優れているものの、力学的な強度が不十分であるものが多い。

そこで、両者の欠点を相互に補完し合うために、合成高分子と天然高分子のブレンド型ナノファイバーの作製も活発に試みられている。PCLやPLAとエラスチンやコラーゲンをブレンドしたナノファイバーは、高い弾性と優れた細胞親和性を有する人工血管として期待されている<sup>32,33)</sup>。また、PCL/炭酸カルシウム(CaCO<sub>3</sub>)<sup>34)</sup>やゼラチン/ハイロドキシアパタイト<sup>35)</sup>のブレンドナノファイバーも研究されており、いずれも優れた骨芽細胞接着性を示していることから骨再生誘導用スキャホールドとして期待されている。さらに、近年はマテリアルソースの豊富なケラチンを基材としたナノファイバーも作製されており、ケラチン中の細胞接着配列(LDV配列やRGD配列)によって優れた細胞親和性を示す<sup>36)</sup>。これらの、多くの研究では、目的とする評価項目では優れた特性が示されているが、生体内で起こる多方面からの生体応答を総合的に評価する事で、真に“生き残る”ナノファイバー材料が決定されることになる。

#### 5. 細胞を用いないGTR用材料

スキャホールドのみを使って、*in vivo*で、組織再生を試みる組織再生誘導法(GTR, Guided Tissue Regeneration)においても、繊維構造はさまざまな影響を有する。特に、歯周組織の再建(GBR, Guided Tissue Regeneration)は、臨床的にも進んでおり、生体吸収性のシートを使って、歯周組織が再生してくれる空間を確保して、自発的な組織誘

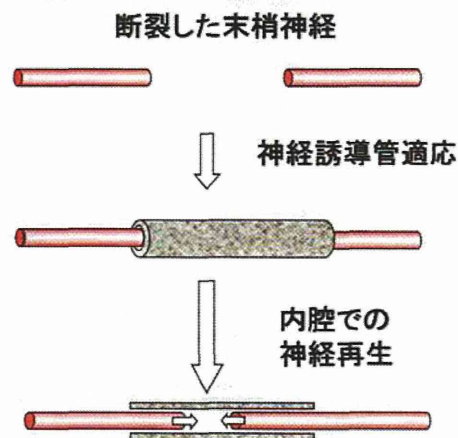


図2 GTRによる末梢神経組織の再生

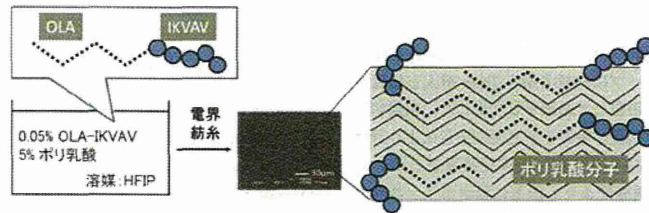


図3 混合溶液を電界防止するだけで、OLA-IKVAV は、ポリ乳酸マトリックスに安定に複合化される。

導に導く手法である。上述したように、ナノファイバーからなる構造体の空隙サイズは小さく、一般的に細胞の進入には適していない。すなわち、GTRにおいて周囲組織の進入を防ぐためには、ナノファイバー構造体の小さな孔径は有効である。たとえば、図2に示した神経誘導管の場合、周囲組織が内腔へと進入することを防ぐこと、さらに、管腔内で再生する神経組織に対して酸素や栄養素を供給するための低分子透過性が重要であることから、ナノファイバー膜構造は極めて有力である<sup>39)</sup>。さらに、繊維の等方的配列は、細胞の分化と増殖に大きく影響を与えることが報告されており、整列ナノファイバーでの神経組織の有為な再生が認められている<sup>40)</sup>。同様に、ステント外周にナノファイバーを付したカバードステントは、組織浸潤と、その結果起こる内膜肥厚を有効に抑制できると期待される<sup>41)</sup>。このような物質透過性と組織浸潤防止機能は、術後の臓器と

組織との癒着を防ぐ癒着防止材としての応用も有効であろう。

さらなる神経組織の再生を促すためには、生理活性分子による機能化修飾が有効である。PLAは、官能基を持たないために修飾が困難である。水溶性に富むペプチド分子は単純な物理コーティングでは安定な修飾が困難である<sup>42)</sup>。また、側鎖にカルボキシル基などの官能基を有するポリ乳酸誘導体は化学修飾が可能な有用な共重合体であるがバルク特性も大きく変化する<sup>43,44)</sup>。我々は、ポリ乳酸表面を化学修飾する新たな修飾プロープとしてオリゴ乳酸(OLA)とペプチド(peptide)との結合体(OLA-peptide)を開発した(図3)<sup>45)</sup>。L-乳酸を直接脱水重合してOLAを合成し、末端をアセチル化した(acOLA)。目的ペプチド配列を固相合成し、上述のacOLAとカップリングすることで修飾プロープが合成できる。PLAの5w/v%のHFIP溶液に100分の1濃度のOLA-peptideを添加して、常法により電界紡糸して複合化した。共焦点レーザー顕微鏡観察により、蛍光標識OLA-peptideはナノファイバー中に相分離することなく安定に複合化できることを確認した。これは電界紡糸法の極めて早い脱溶媒速度が大きく影響している。IKVAVペプチドは、神経細胞接着、増殖、神経突起伸長を促進するペプチド配列であることが1989年Tashiroらによって、ラミニン内から見出された<sup>46)</sup>。このIKVAVの高い神経誘導活性を利用するために<sup>47,48)</sup>、OLA-IKVAVプロープを合成し、エレクトロスピンニング法により内径1.2

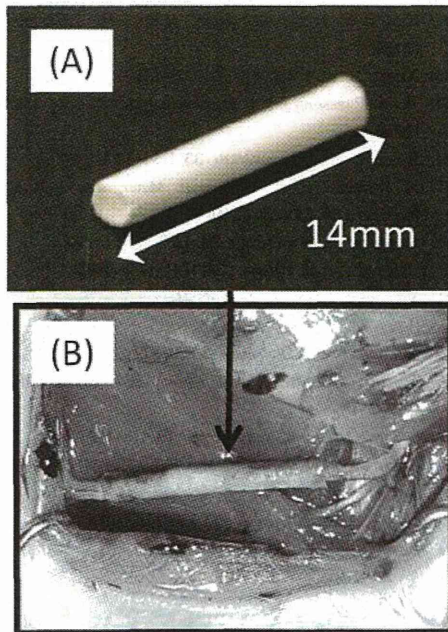


図4 作成した神経誘導管(A)とラット坐骨神経への移植(B)

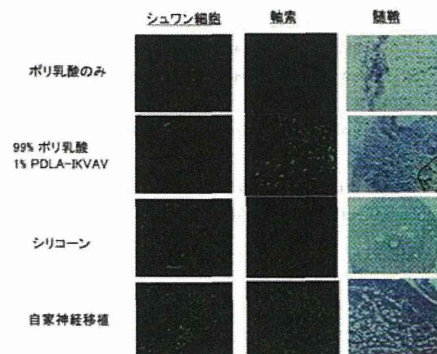


図5 再生した神経の免疫染色像

mm、長さ14mmのポリ乳酸ナノファイバー膜チューブを作製した(図4)。ラット(Wistar rat、メス、8週齢、180-210g)に対して、麻酔下で左肢坐骨神経を10mm長切除し、14mmのガイドチューブに神経末端を2mm挿入して縫合した。所定期間後、屠殺して組織を取り出した。組織切片はパラフィンで固定化後、軸索を蛍光免疫染色により評価した結果、OLA-IKVAVで修飾した神経誘導管において、未修飾のPLA神経誘導管よりも顕著に軸索再生が誘導されていることが確認された(図5)。現在、中空構造を用いているが、超軸方向に神経誘導をガイドできる配列構造の導入が有効と考えさらなる検討を続けている。

## 6. おわりに

上述したように、ナノファイバー構造に限らず、一つの材料特性は生体に対して多面的な影響をおよぼす。目的とする機能の向上を証明することは重要ではあるが、総合的には逆効果になる時も少なくない。優れた血管内皮化と優れた抗血栓性を両立させることは容易ではない。生体材料の多角的評価により、近年の膨大な研究の中に潜む、「ナノファイバーならではの、組織再生につながる機能性」を、慎重に見出すことが重要である。

## 参考文献

- Vacanti C. A. et al. *Plast. Reconstr. Surg.*, **88**, 753-759 (1991).
- Langer R. et al. *Science*, **260**, 920-926 (1993).
- Mikos A. G. et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 183-189 (1993).
- Salem H. K. et al. *Stem Cells*, **28**, 585-596 (2010).
- Evans M. J. et al. *Nature*, **292**, 154-156 (1981).
- Martin G. R. *PNAS*, **78**, 7634-7638 (1981).
- Thomson J. A. *Science*, **282**, 1145-1147 (1998).
- Takahashi K. et al. *Cell*, **126**, 663-676 (2006).
- Takahashi K. et al. *Cell*, **131**, 861-872 (2007).
- Watt F. M. et al. *Science*, **287**, 1427-1430 (2000).
- Lim S. H. et al. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 1084-1096 (2009).
- Li W. J. et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**, 613-621 (2002).
- S. Y. Chew et al. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **97**, 355-374 (2011).
- Awad H. A. et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 233-240 (2000).
- Moroni L. et al. *Biomaterials*, **27**, 4911-4922 (2006).
- Tian F. et al. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **84**, 291-299 (2008).
- Karageorgova V. et al. *Biomaterials*, **26**, 5174-5191 (2005).
- Wake M. C. et al. *Cell Transplant.*, **3**, 339-343 (1994).
- Ying T. H. et al. *Biomaterials*, **29**, 1307-1317 (2008).
- Ishii D. et al. *Biomacromolecules*, **10**, 237-242 (2009).
- Yoshimoto H. et al. *Biomaterials*, **24**, 2077-2082 (2003).
- Xu Inai C. Y. et al. *Biomaterials*, **25**, 877-886 (2004).
- Zong X. et al. *Biomaterials*, **26**, 5330-5338 (2005).
- T. H. Ying et al. *Biomaterials*, **29**, 1307-1317 (2008).
- Matthews J. A. et al. *Biomacromolecules*, **3**, 232-238 (2002).
- McKenna K. A. et al. *Acta Biomaterialia*, **8**, 225-233 (2012).
- Zhang S. et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, **90A**, 671-679 (2009).
- Wnek G. E. et al. *Nano Lett.*, **3**, 213-216 (2003).
- Min B. M. et al. *Biomaterials*, **25**, 1289-1297 (2004).
- Neal R. A. et al. *Tissue Eng.*, **15**, 11-21 (2009).
- Ohkawa K. et al. *Rapid Commun.*, **25**, 1600-1605 (2004).
- Liu Y. et al. *Polym.*, **83**, 1011-1015 (2011).
- Wise S. G. et al. *Acta Biomaterialia*, **7**, 295-303 (2011).
- Han J. et al. *Biomacromolecules*, **12**, 399-408 (2011).
- Heydarkhan-Hagvall S. et al. *Biomaterials*, **29**, 2907-2914 (2008).
- Fujihara K. Kotaki M. et al. *Biomaterials*, **26**, 4139-4147 (2005).
- Kim H. W. et al. *Adv. Funct. Mater.*, **15**, 1988-1994 (2005).
- Xing [C. et al. *IPCBE*, **2**, 120-124 (2011).
- Jkema-Paassena J. L. et al. *Biomaterials*, **25**, 1583-1592 (2004).
- Huang C. et al. *Biomaterials*, **33**, 1791-1800 (2012).
- K. Kuraishi et al. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **88**, 230-239 (2009).
- Shin H. et al. *Biomaterials*, **24**, 4353-4364 (2003).
- Kimura Y. et al. *Polymer*, **34**, 1741-1748 (1993).
- Yamaoka T. et al. *J. Biol. Macromol.*, **25**, 265-271 (1999).
- Kakinoki S. et al. *Polymers*, **3**, 820-832 (2011).
- Tashiro K. et al. *J. Biol. Chem.*, **264**, 16174-16182 (1989).
- Schense J. C. et al. *Nat. Biotech.*, **18**, 415-419 (2000).
- Gunn J. W. et al. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, **72**, 91-97 (2005).
- Silva G. A. et al. *Science*, **303**, 1352-1355 (2004).

## [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。

関す

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。

### 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>12)</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。

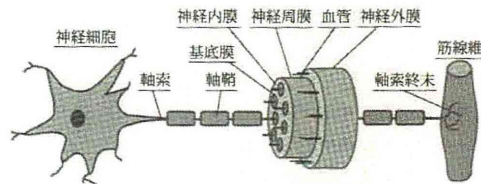


図1 末梢神経の構造

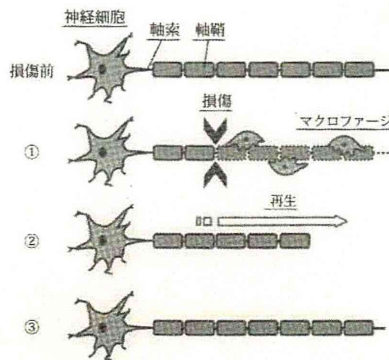


図2 末梢神経の損傷と再生

## 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、ウィ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、ポリ乳酸は生理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、電界紡糸(エレクトロスピンング)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4①)。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4②)。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4③)。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  
分子<sup>9,10)</sup>  
を  
上させ  
られる生  
この神  
高純  
れる。  
の強い  
い神

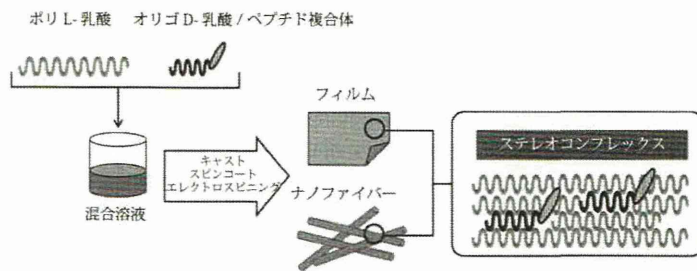


図3 オリゴD-乳酸/ペプチド複合体を利用したポリL-乳酸基材の生理的機能化

図(3)  
(5)

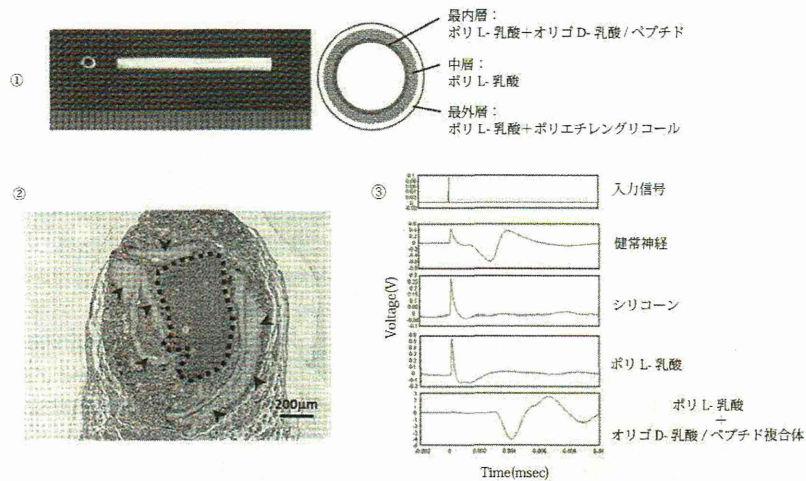


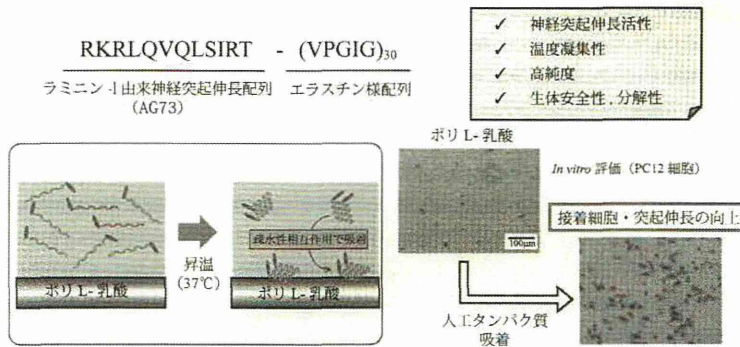
図4 オリゴD-乳酸/ペプチド複合体で機能化されたポリL-乳酸ナノファイバー神経再生誘導管を用いたラット末梢神経再生  
 ① ナノファイバー神経誘導管  
 ② ラット坐骨神経欠損モデルへ移植 24 週後の誘導管中央部の断面 GFAL 免疫染色像 (点線部が GFAP 陽性, 矢印は残存している誘導管)  
 ③ 移植 24 週後脛骨筋の電位測定結果 (文献 16 の図を一部改編)

### 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) $n$  繰り返し配列の生合成<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り返し配列 ((VPGIG) $n$ )<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ると, 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、他の多くの再生医工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良が期待される。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 ME, 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-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, Otake A, Powell SK, Hoffman MP, Kleinman H, Yamada Y. : Cell binding sequences in mouse laminin $\gamma$ 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) $_4$ 0 in Aqueous Solution. *Biomacromolecules* 4(2003)1680-1685