研究報告 2020（KISTEC Annual Research Report,2020）

【研究開発部】

戦略的研究シーズ育成事業

研究テーマ：脳梗塞治療のためのスキャフォールド材料
◆総括・業績･･･ 250
研究代表者：東京医科歯科大学　味岡 逸樹

脳梗塞治療のためのスキャフォールド材料

研究代表者：東京医科歯科大学　味岡　逸樹

【基本構想】

脳梗塞は手足の麻痺などの後遺症が残ることが多く、患者や家族の QOL を著しく低下させる社会問題となっている。脳梗塞には血栓溶解治療と血栓回収治療が有効であるものの、それぞれ発症から 4.5 時間以内、8 時間以内に治療が限定され、特に、概ね発症 3 日後から 1 週間後の亜急性期から慢性期かつ重度の患者に対して治療効果のある、革新的な治療法開発が待ち望まれている。本研究では、亜急性期から慢性期の脳梗塞治療を目的とし、脳梗塞モデルマウスの運動機能回復能を発揮し、臨床応用可能な人工足場を開発する。上記目的を達成するために、脳内投与後に細胞足場として機能するペプチド分子集合体を創製し、機能性タンパク質を細胞足場に配向・徐放させる技術を開発し、脳梗塞モデルマウスにおける運動機能回復を目指す。血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を連続投与すると齧歯類脳梗塞モデルで生じる運動機能障害が回復すると報告されていることから、本研究開発では、VEGF を細胞足場から徐放させ、単回投与で治療効果を発揮する人工足場を開発する。

１．　研究目的

国内死因の第 3 位となっている脳血管障害は、虚血性の脳梗塞と出血性の脳出血とに大別される。中でも脳梗塞は全体の 75%以上を占め、一命をとりとめた場合でも後遺症が残る場合が多く、「寝たきり」の原因の 25%を占めている。脳機能発揮の中心的役割を担う神経細胞（ニューロン）には、血管を介して酸素や栄養分などが供給されているが、脳梗塞虚血によりニューロンの細胞死が起きる。脳ニューロンは皮膚の細胞や肝臓の実質細胞とは異なり増殖能に乏しく、脳組織がほとんど再生しないため、手足の麻痺や言語障害などの後遺症が残ることが多い。脳血管障害の国内の患者数は約 100 万人、年間医療費は約 1.7 兆円であるが、20 年後には患者数が 2 倍になると予想されており、脳梗塞患者の健康寿命の延伸が社会的にも経済的にも渇望されている（図 1）。

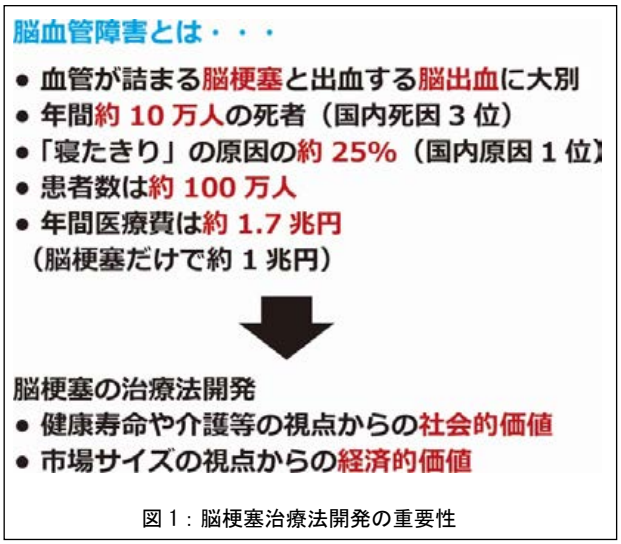

図 1：脳梗塞治療法開発の重要性

最近、血栓溶解治療と血栓回収治療の進歩がめざましく、発症から 8 時間以内の急性期治療の成績が向上している。血栓溶解治療は、2005 年に国内で使用承認された組織型プラスミノゲン・アクティベータ（recombinant tissue-type plasminogen activator: rtPA）を静脈内に投与することで、閉塞した血栓を化学的に溶解させ、脳血流を再開させる治療法である。しかしながら、発症から 4.5 時間以内に使用が制限されており、実施率は約 5%、再貫通率は約 40%にとどまり、2%程度の患者にしか治療効果が得られていない。一方、血栓回収治療は、2010 年に国内で使用承認された血栓除去デバイスを用いて、閉塞した血栓を物理的に取り除き、脳血流を再開させる治療法である。しかしながら、こちらも発症から 8 時間以内に使用が制限されており、再貫通率は約 80%と高いものの、実施率は約 3%にとどまり、2%程度の患者にしか治療効果が得られていない（図 2）。

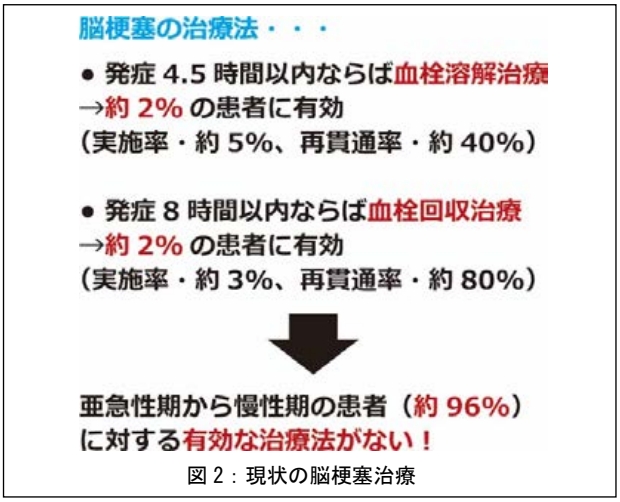

図 2：現状の脳梗塞治療

血栓溶解治療や血栓回収治療の対象外、あるいは治療効果が認められなかった約 96%の患者に対する治療法開発が世界中で繰り広げられている。その中でも、多能性幹細胞や間葉系幹細胞を損傷脳内あるいは静脈内投与する再生医療の治験が国内外で最近開始した。しかしながら、自家移植の場合には品質安定性の問題、他家移植の場合には拒絶反応のリスクの高さから、細胞を利用しない人工物のみで完結する治療法が望ましい。具体的には、生体内に残存している細胞の潜在的再生能力を発揮させる材料が望ましく、細胞の足場として機能する足場（スキャフォールド）材料が注目を浴びている。実際、再生医療の市場規模という視点からも、自家移植や他家移植に比べても規模が大きい（図 3）。

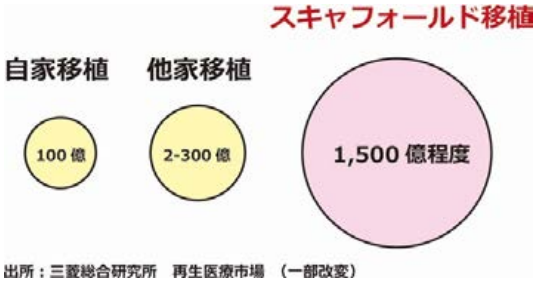

図 3：スキャフォールド材料の市場規模

損傷組織が再生する際には、再生組織に酸素や栄養分などを供給する血管網の再生も同時進行する。また、血管網の再生を促進することで、損傷組織の再生自体が促進される。脳梗塞による損傷領域は、損傷した脳の潜在的再生能力を発揮させるために必要な機能的な血管網に欠く。したがって、損傷した領域に血管網を再生させる戦略は再生環境を整備するという観点からも重要だと考えられる。実際、脳梗塞治療効果のある多能性幹細胞や間葉系幹細胞の移植では、幹細胞が分泌する因子による血管新生促進が重要だと考えられている。血管新生は既存の血管から新しい血管が生み出される現象で、新たに作られた新生血管は、細胞の生存や機能発揮に効果のある酸素や栄養素などを運搬する。血管新生に関与する因子は多数あるが、中でも血管内皮細胞増殖因子（VEGF）は血管内皮細胞の受容体に結合し、増殖や遊走などを促進し、血管新生に重要な様々な生物活性を担う。齧歯類の脳梗塞モデルにおいて、VEGF を脳室内に連続投与すると運動機能障害が回復することが知られており[1,2]、本研究では、VEGF を細胞足場から徐放させ、単回投与で治療効果を発揮する人工足場を開発することを目的とした。

本研究開発におけるタンパク質徐放型細胞足場の分子設計の特徴として、従来のドラッグデリバリーシステム（DDS）材料でよく使われる化学架橋材料ではなく、分子同士の非共有結合で徐放効果を発揮する材料とする点を挙げる。これはヒトへの臨床応用を指向する場合、生体内での分解産物に安全性が求められるが、化学架橋材料では分解産物の安全性を証明するのが困難で、臨床応用への壁が高いという点からの発想である。本研究開発で着目した自己集合型ペプチドゲルは生体内の分解産物が均一なペプチドとなるため、安全性評価が容易で、臨床応用展開が容易となる。

プロジェクト 1 年目となる 2019 年度は、以下の各項目を重点項目として研究開発を行なった。

①ペプチド分子集合体の開発
②VEGF を細胞足場に配向させる技術の開発
③脳梗塞モデルマウスの機能評価系開発

２．　研究成果

以下に挙げるのは、2019 年度の具体的な研究成果である。

①ペプチド分子集合体の開発

我々は人工足場の材料として、ペプチドに着目した。両親媒性ペプチドは疎水性結合やイオン結合により集合体を形成するが、一部のペプチド集合体は、pH やイオン強度の変化でアミノ酸側鎖同士の相互作用が強まりゲル化する。すなわち、試験管内では溶液状で、体内投与後にゲル化するインジェクタブル人工足場としても機能する。最もよく知られているペプチド分子集合体の 1 つに、アミノ酸 16 個からなる RADA16（RADARADARADARADA）がある。しかしながら、RADA16 は粘弾性が高すぎるため、ガラスキャピラリーによる脳内投与が困難であった。そこで我々は、RADA16 よりも粘弾性が低く、脳内投与が容易な RADA16 変異体の同定を試みた。

まずはじめに、超分子化学を専門とする東京農工大学・村岡貴博准教授と計算物理学を専門とする北里大学・渡辺豪講師の協力を得て、自己集合化した RADA16 の構造を分子動力学（MD）シミュレーションにて解析した。この解析では、1 辺 10 nm の立方体の中に 32 分子の RADA16 ペプチドと 30,000 分子の水分子をランダムに配置させ、300 ns 間のシミュレーションを行った。その結果、電子顕微鏡解析の結果と同様にシミュレーションでもファイバー状の集合体形状を示した。次に、RADA16 のアラニンをグリシンに変えた変異体についても同様の解析を行い、16 番目のアラニンをグリシンに置換した RADA16 (A16G)が短い分岐構造を持ったファイバー形状を示すことが明らかとなり、分子間相互作用が弱いながらもファイバー形成することが示唆された。

そこで、村岡らの協力を得て、RADA16 と RADA16 (A16G)を F-moc 法で合成し、CD スペクトル解析、粘弾性解析、電子顕微鏡解析を行い、MD シミュレーション解析の結果で合致するかどうか検討した。CD スペクトル解析では、どちらも β シート構造を取ることが示唆された。また、粘弾性解析では、RADA16 (A16G)が RADA16 の 16.6%のずり弾性率を示し（図 4）、実際に RADA16 より粘弾性が低いことが明らかとなった。

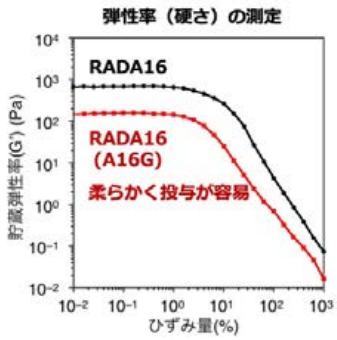

図 4：RADA16 と RADA16(A16G)の弾性率解析

電子顕微鏡解析においてもシミュレーション解析で予想されたように、RADA16 (A16G)ファイバーには多数の分岐構造が認められた。実際、RADA 16 (A16G)はガラスキャピラリーを使って容易に脳内投与することができた。

次に、RADA16 (A16G)が RADA16 と同様に細胞接着性を持つかどうか検討した。具体的には、1%の RADA16 (A16G)および RADA16 溶液をカバーガラスに塗布し、乾燥後に線維芽細胞を播種した。培養 3 時間後に接着した細胞数を測定するため、DAPI で核を染色し、ステレオロジーにて細胞数を計測した。その結果、RADA16 (A16G)は RADA16 と同様な細胞接着能を持つことが示唆された。

以上の結果から、細胞接着能を持ち、RADA16 よりも粘弾性が低く、脳内投与が容易な RADA16 変異体、RADA16 (A16G)を同定した [3]。

②VEGF を細胞足場に配向させる技術の開発

RADA16 (A16G)足場に VGEF を非共有結合で配向させ、徐放させる技術開発を試みた。具体的な方法は知財保護の観点から記載を省くが、はじめに緑色蛍光タンパク質 GFP を用いて RADA16 (A16G)集合体に非共有結合で配向させる技術と徐放させる技術を確立した。試験管内での GFP 徐放量は ELISA 法にて評価し、徐放効果を確認した（特願 2020-045109）（図 5）。また、データを示していないが、VEGF も同様の技術で配向および徐放させることに成功した（特願 2020-045109）。

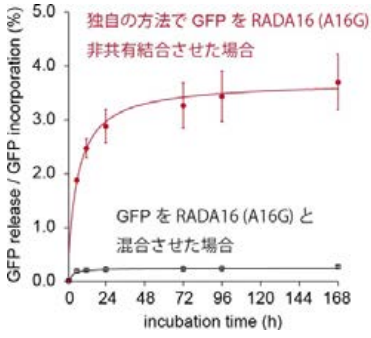

図 5：全長タンパク質の徐放技術の検証

③脳梗塞モデルマウスの機能評価系開発

VEGF を徐放する RADA16 (A16G)を投与する損傷脳モデルとして、中大脳動脈遠位部梗塞モデルとローズベンガル投与モデルを検討した。

中大脳動脈遠位部梗塞モデルは以下のように作製した。6 週齢の C57BL/6J マウスを 3%イソフルランで麻酔をかけ、右耳の下から目の付近まで皮膚を開けた。次に、側頭筋を切断し脳前方に向けて頭蓋骨から切り離し、頭蓋骨の上から右中大脳動脈遠位部が確認できるようにした。中大脳動脈遠位部を覆う頭蓋骨をマイクロドリルを使って直径 1 mm 程度の穴をあけ、中大脳動脈遠位部にアクセスできるようにした。微小ピンセットと微小血管焼灼器を用いて中大脳動脈遠位部を切断し、止血ガーゼを当てて止血した。2-3 分後に止血ガーゼを取り除き、ヒーターマットの上でマウスの回復を待った。

ローズベンガルモデルは以下のように作製した。6 週齢の C57BL/6J マウスを 3%イソフルランで麻酔をかけ、脳定位装置にセットした。ブレグマの上下 4 mm が露出するように、頭蓋骨を覆う皮膚を開いた。ブレグマから「右方 0.7 mm, 前方 2.5 mm」、「右方 0.7 mm、後方 1.0 mm」、「右方 2.7 mm、後方 1.0 mm」、「右方 2.7 mm、前方 2.5 mm」の 4 点に印を付け、その周辺部を遮光テープで覆った。その後、10 mg/ml のローズベンガル溶液を 100 uL 腹腔内投与し、5 分後にハロゲンランプで上記長方形領域を 10 分間照射した。照射後は皮膚を閉じ、ヒーターマットの上でマウスの回復を待った。

手術 7 日後に歩行機能解析を行い、その後、4% PFA で灌流固定した。歩行機能解析は、名古屋市立大学・澤本和延教授と金子奈穂子准教授の協力を得て、実験系を立ち上げた。具体的には、亀甲金網の上で術後マウスを 10 分間自由に歩かせ、動画を記録し、総歩数と亀甲金網から足を滑らせた回数を測定し、足を滑らした割合を算出した。形態学的解析は、ニューロンのマーカーNeuN と活性化ミクログリアのマーカーIba1 の免疫組織染色で損傷領域を観察した。ローズベンガルモデルでは、大脳皮質運動野を光照射したが、形態学的解析でも大脳皮質運動野の傷害が確認された。一方、中大脳動脈遠位部梗塞モデルでは、血管支配領域である大脳皮質連合野の傷害が確認された。歩行機能解析では、どちらのモデルでも歩行機能異常が認められ、どちらのモデルの実験系確立にも成功した。なお本研究では、ヒト脳梗塞に近い血管梗塞モデルを選択することにした。

今後の展開を以下に述べる。

①ペプチド分子集合体の開発

抗原性の低いペプチド分子集合体を創製する。具体的には、免疫系細胞に認識されにくい 12 アミノ酸あるいはそれ以下のアミノ酸でゲル化するペプチド分子集合体を開

発する。また、RADA16 (A16G)は酸性から中性への変化でゲル化するため、実用化する際には RADA (A16G)を付加した生理活性タンパク質を酸性条件下で精製する必要があり、タンパク質が失活する可能性が高い。そこで今後は実用化を見据えて、中性条件下でゲル化し、12 アミノ酸以下のペプチド分子集合体を開発する。

②VEGF を細胞足場に配向させる技術の開発

上記で開発した中性ペプチド分子集合体を用い、VEGF を配向結合させる。

③脳梗塞モデルマウスの歩行機能回復達成

VEGF を結合させたペプチド分子集合体を投与し、投与 7, 14, 28, 56 日後における歩行機能テストにて脳梗塞回復能を評価する。また、形態学的解析や逆遺伝学的解析により作用機序を解明する。なお、本研究における達成目標を歩行機能テストでの 50%回復とする。

参考文献

1. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. J Clin Invest. 2000;106(7):829-838. doi:10.1172/JCI9369
2. Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. J Clin Invest. 2003;111(12):1843-1851. doi:10.1172/JCI17977
3. Ishida A, Watanabe G, Oshikawa M, Ajioka I, Muraoka T. Glycine Substitution Effects on the Supramolecular Morphology and Rigidity of Cell-Adhesive Amphiphilic Peptides. Chem Eur J. 2019;25(59):13523-13530. doi:10.1002/chem.201902083

業　績

【原著論文】

1. Ishida A, Watanabe G, Oshikawa M, Ajioka I, Muraoka T.
   Glycine Substitution Effects on the Supramolecular Morphology and Rigidity of Cell-Adhesive Amphiphilic Peptides.
   Chem Eur J. 2019 Oct 22;25(59):13523-13530.
   （Cover Picture に採用され Profile として紹介された https://doi.org/10.1002/chem.201903871 ）

【口頭発表】

1. Itsuki Ajioka
   Cell Cycle Dysregulation: Understanding Neuropathology of Degeneration and Tumor
   XXVII Annual Meeting of Indian Academy of Neurosciences
   2019.11.20 ニューデリー（インド）

2. 味岡 逸樹, 佐々木 陽一, 押川 未央, 君塚 信夫, 楊井 伸浩.
   フォトン・アップコンバージョンゲルの創製による近赤外光オプトジェネティクス.
   第 92 回日本生化学大会
   2019.09.20 横浜

3. Itsuki Ajioka, Yoichi Sasaki, Mio Oshikawa, Nobuhiro Yanai.
   Near-infrared optogenetics by photon upconversion hydrogels.
   第 11 回光操作研究会 2019.09.11 名古屋

4. Itsuki Ajioka, Mio Oshikawa, Yoichi Sasaki, Nobuhiro Yanai.
   Near-infrared optogenetics by photon upconversion hydrogels.
   ISN-ASN Meeting 2019.08.07 モントリオール（カナダ）

5. Itsuki Ajioka.
   Molecular technology regulating the vascular environment for injured brain regeneration.
   Neuro2019 2019.07.28 新潟

【特許】

1. 国内特許出願　2 件