

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^{1, 2}、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渴望されている (図 1)。

脳血管障害とは・・・

- 血管が詰まる**脳梗塞**と出血する**脳出血**に大別
- 年間約 **10 万人**の死者 (国内死因 3 位)
- 「寝たきり」の原因の約 **25%** (国内原因 1 位)
- 患者数は約 **100 万人**
- 年間医療費は約 **1.7 兆円**
(脳梗塞だけで約 1 兆円)

↓

脳梗塞の治療法開発

- 健康寿命や介護等の視点からの**社会的価値**
- 市場サイズの視点からの**経済的価値**

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)。

脳梗塞の治療法・・・

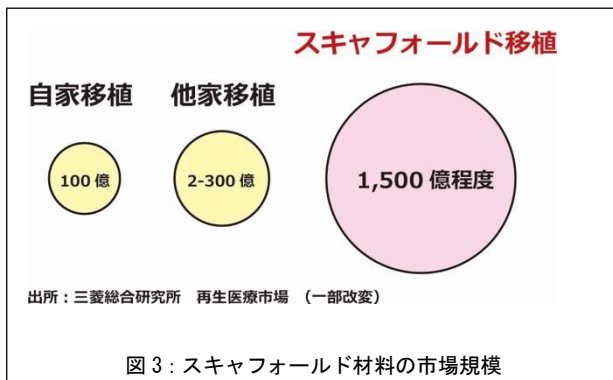
- 発症 4.5 時間以内ならば**血栓溶解治療**
→約 **2%**の患者に有効
(実施率・約 5%、再貫通率・約 40%)
- 発症 8 時間以内ならば**血栓回収治療**
→約 **2%**の患者に有効
(実施率・約 3%、再貫通率・約 80%)

↓

**亜急性期から慢性期の患者 (約 96%)
に対する有効な治療法がない!**

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。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發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）。



損傷組織が再生する際には、再生組織に酸素や栄養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發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、細胞の生存や機能發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發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發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2年目となる2020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新規ペプチド分子集合体の開発
- ②全長タンパク質を細胞足場から徐放させる技術の開発
- ③脳梗塞モデルマウスの治療効果の検討

2. 研究成果

以下に挙げるのは、2020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 (RADARADARADARA) 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2019年度に、RADA16 よりも粘弾性が低く、脳内投与が容易な RADA16 変異体で16番目のアラニングリシンに置換した RADA16(A16G) を創製した³。しかしながら、RADA16 関連ペプチドは、酸性から中性に変化すると相互作用が強まるため、生理活性物質の失活や生体組織の損傷を惹起する酸性条件下で投与せざるを得ないという問題点があった。そこで我々は、超分子化学を専門とする東京農工大学・村岡貴博教授と計算物理学を専門とする北里大学・渡辺豪講師との共同研究にて、中性において炭酸イオン存在下でゲル化する超分子ペプチド X を開発した（特願 2020-128805）。なお、知財保護の観点から、本研究報告書ではペプチド X の詳細な情報は割愛する。

まずはじめに、ペプチド X の分子集合体構造を分子動力学（MD）シミュレーションにて解析した。この解析では、1辺10nmの立方体の中にペプチド X が水分子中で濃度15%となるように初期構造を作成して、シミュレーションを行った。その結果、ペプチド X がファイバー状の集合体形状を示し（図4）、ゲル化することが予想された。

そこで、ペプチド X を Fmoc 法で合成し、炭酸イオン存在下における物性を CD スペクトル解析、動的粘弾性解析、電子顕微鏡解析にて検証し、MD シミュレーション解析の結果と合致するかどうか検討した。その結果、シミュレーションで予想されたように、ファイバー状の集合体形状を示し、ゲル化することが明らかとなった（図5）。

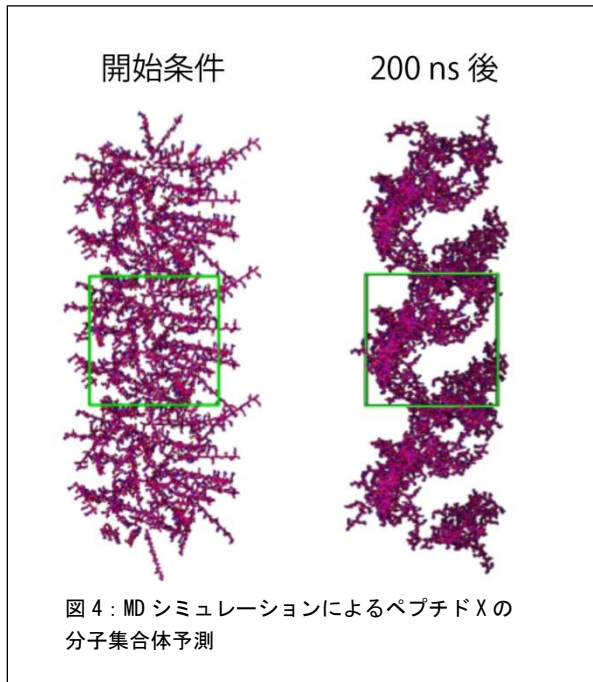


図 4: MD シミュレーションによるペプチド X の分子集合体予測

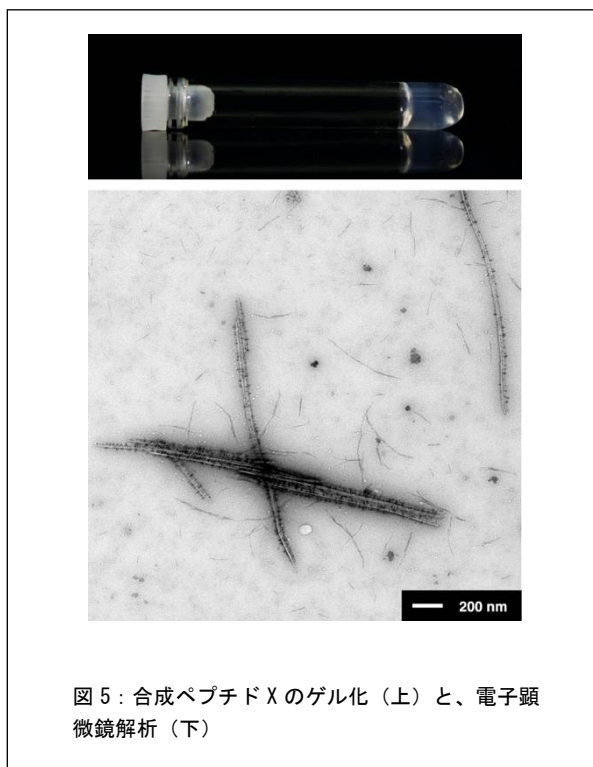


図 5: 合成ペプチド X のゲル化 (上) と、電子顕微鏡解析 (下)

次に、ペプチド X の細胞接着性を検討した。1% のペプチド X 溶液 50 μ L をチャンバースライドに滴下し、減圧乾燥でコートした。1.8x10⁵ 個の 3T3 細胞を 10% 血清の含まれた DMEM 培地に懸濁し、ペプチドをコートしたチャンバースライドに播種し、CO₂ インキュベーターで 30 分間培養して接着させた。非接着細胞を PBS で洗浄して取り除き、接着細胞を 4% PFA で固定して DAPI 染色した。その結果、シリコナイズ処理や未処理のチャンバースライドに比べ、ペプチド X コートで接着細胞数が増加し(図 6)、

ペプチド X が細胞接着性を持つことが明らかとなった。

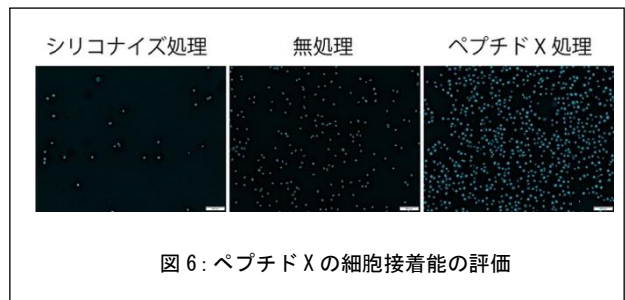


図 6: ペプチド X の細胞接着能の評価

②全長タンパク質を細胞足場に配向させる技術の開発

自己集合化したペプチド X に VEGF 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 を用いてペプチド X 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 2020-146597)(図 7)。その結果、RADA16 に比べてペプチド X の方が GFP 徐放量が多いことが明らかとなった。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 2020-146597)。

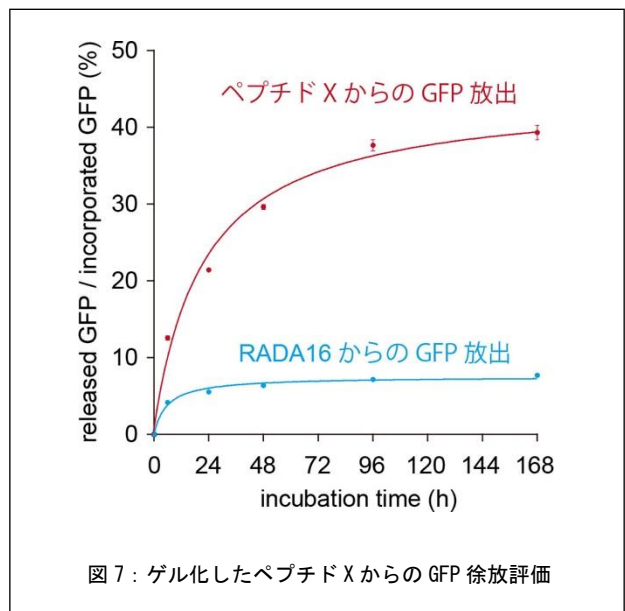


図 7: ゲル化したペプチド X からの GFP 徐放評価

③脳梗塞モデルマウスの治療効果の検討

VEGF を徐放するペプチド X を投与する実験では、中大脳動脈遠位部梗塞 (dMAO) モデルとローズベンガル投与モデルの異なる 2 つの脳梗塞モデルにおける治療効果を検討した。

dMCAO 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。手術 7 日後に歩行機能解析を行い、その後、VEGF を徐放させる処理をしたペプチド X を損傷脳領域に 2 uL 投与し、投与 7 日後に歩行機能解析を行った。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 (図 8)。なお、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。解析の結果、VEGF 徐放群は対照群 (PBS 投与群) に比べて歩行機能が顕著に回復していることが判明した (図 9)。

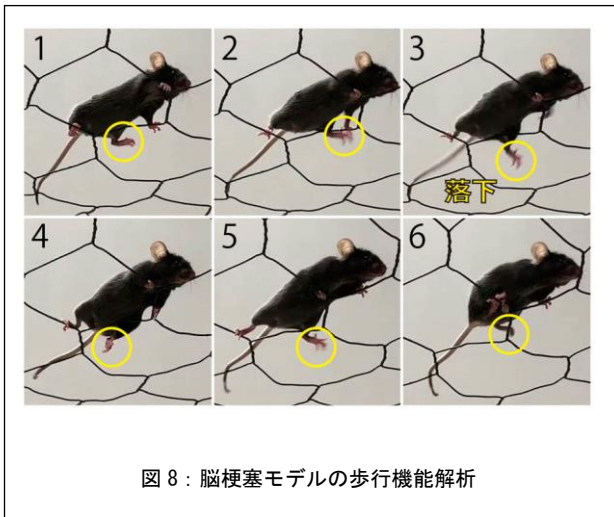


図 8：脳梗塞モデルの歩行機能解析

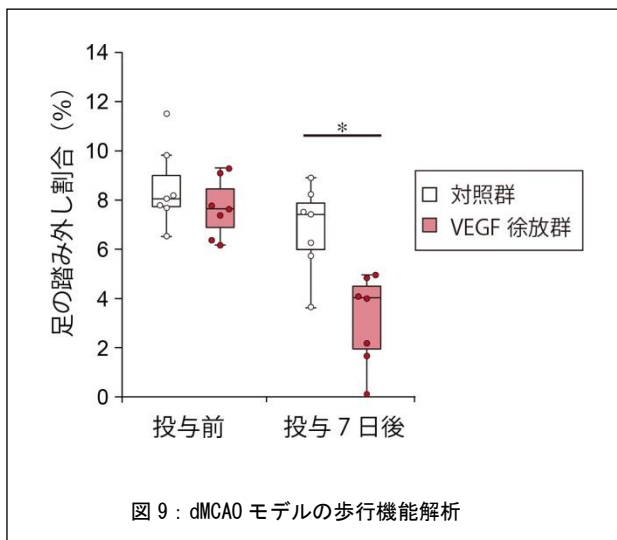


図 9：dMCAO モデルの歩行機能解析

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reg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reg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。

dMCAO モデル実験と同様に、手術 7 日後に歩行機能解析を行い、その後、VEGF を徐放させる処理をしたペプチド X を損傷脳領域に 2 uL 投与した。歩行解析の結果、ローズベンガル投与モデルにおいても、VEGF 徐放群は対照群 (PBS 投与群) に比べて歩行機能が顕著に回復していることが判明した (図 10)。

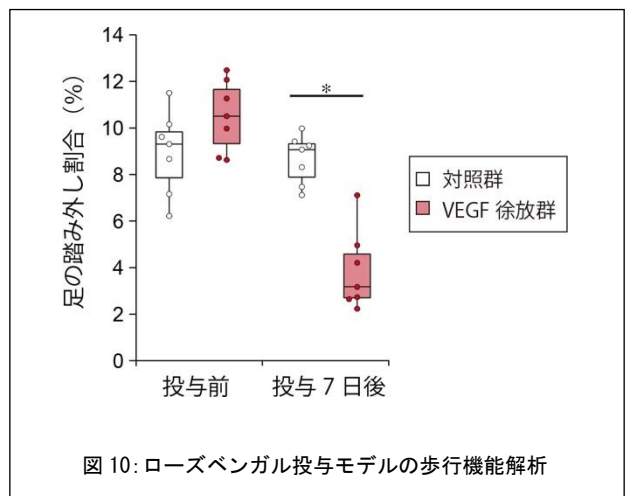


図 10：ローズベンガル投与モデルの歩行機能解析

以上まとめると、新規ペプチド X の開発により、全長タンパク質を細胞足場から効果的に徐放させることに成功し、VEGF を徐放するペプチド X の脳内単回投与で治療効果を発揮することを明らかにした。本研究プロジェクトは、2021 年度より有望シーズ展開事業「超分子ペプチドを用いた脳梗塞の再生医療プロジェクト」として引き続き研究開発を進めていく。

今後の展開を以下に述べる。

①ペプチド X を用いた脳梗塞再生治療への展開

非臨床 POC 取得を目指した開発を進めていく。具体的には、投与時期の確定、投与方法の確定、投与量の確定、製造方法の確定に加えて、再生メカニズムの解明も進めていく。投与時期に関しては、現在、慢性期脳梗塞患者への介入はリハビリに限られており、ペプチドの投与が慢性期でも効果があれば、本技術の価値が高まる。そこで、発症 7 日後以降にペプチドを投与し、機能回復効果のある最も遅い時期を決定する。投与方法に関しては、損傷中心部、損傷周辺部 (ペナンブラ)、脳室内投与の 3 つを検討し、投与部位を決定する。製造方法に関しては、GMP レベル

での製造を行う。

②超分子ペプチド（ペプチド分子集合体）のプラットフォーム技術化

高分子は低分子の共有結合で作られる。したがって、生体内での分解産物の分子構造が不明確で多様性に富み、生体内での安全性を証明することが難しい。一方、超分子ペプチドはペプチドの非共有結合で作られるため、生体内での分解産物が原材料のペプチドとなる。我々は、物理／化学／生物学の叡智を結集させて、所望の物性を持つ超分子ペプチドの設計方法を確立してきた。超分子ペプチドは脳梗塞治療薬以外への展開も期待され、今後は超分子ペプチドを多方面に展開させることも目指す。

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, Oshikawa M, Ajioka I, Muraoka T.
Sequence-Dependent Bioactivity and Self-Assembling Properties of RGD-Containing Amphiphilic Peptides as Extracellular Scaffolds
ACS Applied Bio Materials, 3, 6, 3605–3611, 2020,

樹, 村岡 貴博

二次構造変化を示す自己集合性ペプチドの開発と高強度ゲルの構築
日本化学会第 10 春季年会
2021.3.21 オンライン

【口頭発表】

1. 味岡 逸樹
化学に立脚した神経再生研究
第 13 回 神経化学の若手研究者育成セミナー
2020.9.9 オンライン
2. 味岡 逸樹, 村岡 貴博, 渡辺 豪
神経と血管の相互作用を人為操作する超分子ペプチド材料
第 63 回日本神経化学会大会
2020.9.12 ライブ配信
3. 味岡 逸樹, 村岡 貴博, 渡辺 豪
損傷脳の機能回復を能動的に制御するペプチド分子集合体材料の設計と評価
第 69 回高分子討論会
2020.9.17 オンライン
4. 矢口 敦也, 押川 未央, 渡辺 豪, 平松 弘嗣, 味岡 逸樹, 村岡 貴博
高い強度と刺激応答性を兼ね備えた超分子ペプチドゲル化剤の開発と応用
第 10 回 CSJ 化学フェスタ 2020
2020.10.20-22 オンライン
5. 矢口 敦也, 押川 未央, 渡辺 豪, 平松 弘嗣, 味岡 逸樹, 村岡 貴博
膜タンパク質から着想した両親媒性ペプチドのゲル化挙動
2020 年 繊維学会秋季研究発表会
2020.11.6 オンライン
6. 味岡 逸樹
超分子ペプチドを利用した脳梗塞再生治療研究 -分野融合研究の難しさと面白さ-
北里大学・第 35 回 若手 Lab・第 7 回 北里材料科学セミナー
2020.11.27 神奈川
7. 矢口 敦也, 押川 未央, 渡辺 豪, 平松 弘嗣, 味岡 逸

【特許】

1. 国内特許出願 2 件
2. 外国特許出願 1 件