

研究概要集2023 目次 【研究開発部】

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

◆ 総括	58
◆ JigSAPによる亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けたげっ歯類での実証実験	61
◆ JigSAPによる亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けた形態学的定量解析系の確立	64
◆ 業績	67

「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

プロジェクトリーダー 味岡 逸樹

【基本構想】

国内死因の第3位となっている脳血管障害のうち、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、我が国の「寝たきり」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）は、皮膚や肝臓の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。

一方、医師の側にも悩みがある。脳梗塞発症後4.5時間以内であれば血栓溶解治療薬を投与できるが、2%程度の患者にしか治療効果が得られていない。発症8時間以上の患者に対しては安定期まで見守ることしかできず、医師もまた、亜急性期の重度脳梗塞患者に効果のある何らかの治療法を求めているのが現状である。

戦略的研究シーズ育成事業（「脳梗塞治療のためのスキャフォールド材料」）では、生体適合性が高く、脳内投与に適した硬さに分子設計した16アミノ酸からなる両親媒性ペプチド (RADA)₃-RADGを開発した。

本プロジェクトでは、この超分子ペプチドを革新的な医薬品へと開花させるため、低免疫原性の短いアミノ酸からなる両親媒性ペプチドを開発し、「細胞フリー再生治療医薬品」への展開を実現する。なお本プロジェクトは神奈川県が掲げる「ヘルスケア・ニューフロンティア」事業の一角としても研究を進めている。

また、超分子ペプチドの概念を含め、生体組織を構成する分子の配列・集積構造とダイナミクスを模倣した材料が、破綻した生体内生命反応システムを修復し、生体が本来持つ再生能力を賦活化させることで、疾患治療に役立つと私達は考える。その実現には、「生体内環境」で生体分子と同様の集積構造やダイナミクスを持つ合成機能分子を「設計（計算科学）」し、「開発（有機化学）・評価（分析化学）」し、「適合化（生物学）」する学術基盤が求められる。その基盤構築に向け、「生体内をフィールドとする物理学、化学、生物学の融合」を目指し、関連する研究を第一線で行っている研究者を招いて議論する「生体内超分子システム研究会」を立ち上げ、生体分子の変性や生体組織の損傷修復を制御するための学術基盤構築を目指す。

1. 2022年度の研究目的

プロジェクト2年目となる2022年度は、以下の各項目を重点項目として開発を進めた。

(1) 亜急性期脳梗塞の臨床応用を目指した X-JigSAP (Jigsaw-Shaped Self-Assembling Peptide) の開発

2021年度までに、短いアミノ酸からなり、中性でゲル化し、タンパク質の取り込みと徐放を達成する新規11アミノ酸からなるペプチド (Ac-RIDARMRADIR-NH₂) JigSAPを開発した (図 1a-d)。JigSAPは、凹凸を持つ組木状の疎水面を有しており、合致する凹凸部との選択的疎水性相互作用と、水素結合によるβシート形成によって自己選択的に一次元集積する。凹凸状疎水面は、グリコホリンAなどのホモ二量体蛋白質に広く見られる構造であり、その特徴的な構造モチーフであるAXXXA配列やGXXXG配列は、αヘリックスからβストランドへとコンフォメーション変化することが知られている。実際にJigSAPは、水中

でヘリックスからβシートへの構造変化を示してゲル化し、この動的変化と並行して粘弾性も増加した (図 1e-h)。JigSAPはこの動的特性のため、溶解直後に脳内投与しやすい柔らかさを有している点が特徴である。

JigSAPを使って脳梗塞後の血管新生を促進させるために、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) のC末端にJigSAP配列を付加し、約1週間かけて徐放させる技術を確立し、マウス中大脳動脈遠位部梗塞 (dMCAO) モデルと光化学反応誘発性血栓形成 (PT) モデルの2種類の脳梗塞モデルマウスを用いて、VEGF-JigSAPの治療効果を検討し、脳梗塞発症1週間後の脳内単回投与で歩行機能改善を認めた。また、血管内皮細胞の増殖促進と数の増加、および、ニューロン数減少の抑制を認め、VEGF-JigSAPによる亜急性期脳梗塞モデルの治療効果は血管新生とニューロン細胞死抑制効果の影響によるものと示唆された (図 1: Yaguchi et al., Nat Commun 2021)。

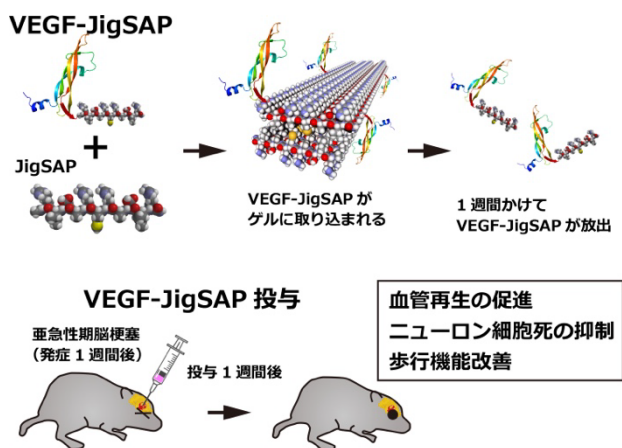


図1: JigSAPによるハイドロゲル形成
 a, Ac-RIDARMRADIR-NH₂ (JigSAP)の空間充填モデル。凹凸状の疎水性表面を示す。 b, MDシミュレーションにより得られたJigSAPの水中超分子構造のスナップショット。 c, 37°Cで48時間培養したJigSAPの写真(ペプチド濃度: 1.0 wt%, pH 7.4)。矢印はハイドロゲルを示す。 d, JigSAPの透過型電子顕微鏡写真。 e, f, JigSAPの貯蔵弾性率(G' , 赤)と損失弾性率(G'' , 青)の時間変化。 g, h, JigSAPの円二色性(CD)スペクトル。 h, JigSAPのCDシグナル強度の時間変化(217.6 nm)。

しかしながら、亜急性期脳梗塞の治療効果を持つVEGFは血管透過性作用があることから未だ臨床応用されておらず、また、化学合成では製造できない分子量の大きいタンパク質のため、製造費用を抑えられるペプチド合成で製造できないという問題点がある。そこで本年度は化学合成で作製できる大きさで別疾患で臨床応用されているXに着目し、X-JigSAPの作製およびX-JigSAPのマウス亜急性期脳梗塞モデルに対する治療効果を検討した。

(2) 損傷脳再生メカニズムの解明

亜急性期脳梗塞モデルマウスへのVEGF-JigSAP投与により損傷周辺部(ペナンプラ)における血管新生促進および神経細胞死抑制効果が見出されたが、歩行機能改善効果との因果関係は明らかとなっていない。そこで2022年度は、VEGF-JigSAPによる歩行機能改善の作用機序の解明に着手した。

(3) 形態学的な再生を定量的に評価する実験系の開発

2021年度では、KSPに設置した超高解像共焦点顕微鏡(LSM900 AiryScan2, Zeiss)と三次元画像解析ソフト(Imaris, Zeiss)を駆使して、脳梗塞による血管の萎縮や新生を調べるための血管体積と血管分岐を定量化する実験系を確立した。そこで2022年度は、脳梗塞損傷後の神経細胞におけるスパイン形成能の定量的解析手法の確立を目指した。

(4) ニューロン遊走を促進する超分子ペプチド開発

哺乳類の脳は、損傷後に失われた神経細胞を再生し機能を回復させる能力が非常に限られており、生体材料を用いて内因性神経幹細胞由来の新生ニューロンの遊走を促進できれば、損傷後の脳の回復を助ける新しいアプローチとして期待される。一方で、新生ニューロンの遊走を誘導する足場となる細胞あまりないため、遠くの損傷部位に新生ニューロンを遊走させることは難しい。そこで2022年度は、新生ニューロンの細胞遊走足場として細胞接着因子N-カドヘリンの重要性を見出した名古屋市立大学・澤本和延教授との共同研究として、N-カドヘリンの細胞外ドメインを人工足場表面に提示する超分子ペプチドの開発を目指した。

(5) 「生体内超分子システム研究会」の立ち上げ

超分子ペプチドの概念を含め、生体組織を構成する分子の配列・集積構造とダイナミクスを模倣した材料が、破綻した生体内生命反応システムを修復し、生体が本来持つ再生能力を賦活化させることで、疾患治療に役立つと我々は考える。その実現には、「生体内環境」で生体分子と同様の集積構造やダイナミクスを持つ合成機能分子を「設計(計算科学)」し、「開発(有機化学)・評価(分析化学)」し、「適合化(生物学)」する学術基盤が求められる。その基盤構築に向け、「生体内をフィールドとする物理学、化学、生物学の融合」を目指し、関連する研究を第一線で行っている研究者を招いて議論する「生体内超分子システム研究会」を立ち上げた。

2. 2022年度の研究成果

(1) 亜急性期脳梗塞の臨床応用を目指したX-JigSAP (Jigsaw-Shaped Self-Assembling Peptide)の開発

化学合成で作製でき、臨床応用可能なXに着目し、X-JigSAPの作製およびX-JigSAPのマウス亜急性期脳梗塞モデルに対する治療効果を検討した。その結果、X-JigSAPにもVEGF-JigSAPと同様の機能回復効果を見出した。なお、この詳細は研究員・原の研究報告欄に記載した。

(2) 損傷脳再生メカニズムの解明

VEGF-JigSAPによる歩行機能改善の作用機序を解明するために、遺伝子発現プロファイル解析結果を基に、抗炎症性サイトカインIL10に着目し、マウス亜急性期脳梗塞モデルに対する作用を検討した。その結果、VEGF-JigSAPやX-JigSAPとは異なり、IL10-JigSAP投与では歩行機能が悪化することを見出した。なお、この詳細は研究員・原の研究報告欄に記載した。

(3) 形態学的な再生を定量的に評価する実験系の開発

脳梗塞損傷後のニューロンにおけるスパイン形成能の定量的解析手法を確立するために、大脳皮質のVおよびVI層の興奮性ニューロンで黄色蛍光タンパク質 YFP を発現する Thy1-YFP マウスを用いて樹状突起スパインの数を計測する実験系を確立した。この詳細は準研究員・秋本の研究報告欄に記載した。

(4) ニューロン遊走を促進する超分子ペプチド開発

JigSAP は取り込んだタンパク質を放出する性質があるため、N-カドヘリンの細胞外ドメインを人工足場表面に提示するための超分子ペプチドは RADA16 および、RADA16 より粘弾性が低く脳内投与が容易な RADA16(A16G)を用いて検討した。その結果、A16G は脳内投与後での凝集が RADA16 に比べて抑えられ、細胞-細胞間へと分散する性質を持ち、人工足場としての性質に優れていることが示唆された。そこで、A16G を人工足場とし、N-カドヘリンの細胞外ドメインを足場表面に提示する超分子ペプチドゲルを作製した。この詳細は準研究員・秋本の研究報告欄に記載した。

(5) 「生体内超分子システム研究会」の立ち上げ

2022年6月10日に第1回生体内超分子システム研究会を開催した。今回は味岡・村岡・渡辺のラボメンバーの交流を深めるため、2日間にわたる研究会を開催し、計算物理学、有機化学、神経生物学の異分野研究者の発表を通じて相互理解と異分野融合研究を牽引する研究者育成に努めた(図2)。



図2：第1回生体内超分子システム研究会の様子
医科歯科大・味岡、農工大・村岡、北里大・渡辺のラボメンバーが集まり、口頭およびポスター発表を行い、異分野研究者との相互理解と交流を深めた。

2022年9月22日には、第2回生体内超分子システム研究会として九州大・楊井先生をお招きし、「励起三重項を用いた光・スピン変換機能」というタイトルで対面のみの講演会として開催した(図3左)。

2022年11月29日には、第3回生体内超分子システム研究会として、東工大・神谷先生と同志社大・金子先生をお招きし、それぞれ「オリジナル化学プローブの創製によるバイオイメーキング」「成体脳で生まれる神経細胞の挙動制御と傷害脳の再生」というタイトルで対面のみの講演会として開催した(図3中)。

2023年2月27日には、第4回生体内超分子システム研究会として、奈良医大・森先生と東北大・横山先生をお招きし、それぞれ「相分離の駆動・制御・破綻と神経難病」「クライオ電子顕微鏡を駆使した翻訳システム動態の可視化」というタイトルで対面のみの講演会として開催した(図3右)。



図3：第2-4回生体内超分子システム研究会のポスター
第2回から第4回までは、本分野で活躍する研究者を招き、研究発表していただき、生体分子と同様の集積構造やダイナミクスを持つ合成機能分子を「設計(計算科学)」し、「開発(有機化学)・評価(分析化学)」し、「適合化(生物学)」する学術基盤の構築に尽力した。

これらの研究会における議論を経て「生体内環境」で生体分子と同様の集積構造やダイナミクスを持つ合成機能分子を「設計(計算科学)」し、「開発(有機化学)・評価(分析化学)」し、「適合化(生物学)」する学術基盤の構築の第一歩を踏み出した。

JigSAP による亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向け たげっ歯類での実証実験

「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
原 央子

1.はじめに

損傷した組織の再生において、細胞外マトリックス (ECM)は、細胞間基質接着のみならず分泌タンパク質の放出/取込みや増殖の制御などの様々な役割を担っている。脳梗塞によって損傷した脳に、ECMを人工的に配置し、さらに増殖因子の足場や放出源にできるなら、組織再生や機能回復に有用と期待される。我々が作成した 11 アミノ酸からなる JigSAP (Jigsaw-shaped Self Assembling Peptide) は、ジグソー型疎水性表面を持つ分子を模して開発したもので、細胞接着性を有し、生理的条件下において自己組織化して超分子ナノファイバーを形成する。この JigSAP は、ハイドロゲル化して細胞の良い基質となり、さらに非共有結合させた因子を緩やかに放出 (徐放)する利点を有する。

昨年度、亜急性期脳梗塞の治療効果を持つ VEGF を JigSAP 融合血管内皮細胞増殖因子(VEGF-JigSAP)と混合し、遠位中大脳動脈閉塞(dMCAO)脳梗塞マウスモデルの亜急性期に、単回注入で VEGF の徐放を行い、組織再生を試みた。結果、行動解析により歩行機能の改善を示した。しかしながら、VEGF には血管透過能もあることから、いまだ臨床応用されていない。また、化学合成では製造できない分子量の大きいタンパク質のため、臨床応用に向けて莫大な製造費用を要するという問題点もある。VEGF-JigSAP を用いた治療研究での手法を生かし、今年度、臨床応用に適した化学合成可能な生理活性物質 X を用いて、研究開発を展開した。

加えて、今年度、JigSAP と急性期の脳梗塞マウスモデルを用い、損傷脳のメカニズム解明を試みた。脳梗塞により脳の一部分に傷害が起こると神経炎症反応が起こり、それに対して梗塞部位と周辺組織では免疫応答し、炎症性と抗炎症性のサイトカインが放出されることがわかっている。炎症性と抗炎症性の両方のサイトカインが放出され炎症が維持されると、しだいに神経損傷に至り、神経回路と機能の悪化から慢性的な運動機能障害などの症状が現れると考えられている。抗炎症性サイトカインを脳梗塞損傷部位に徐放することにより、脳梗塞後の炎症反応を低下させたマウスの歩行機能評価を行った。炎症と回復の関係を評価して、脳梗塞治療メカニズムの解明を目指している。

2. 実験と結果

2.1 亜急性期脳梗塞の臨床応用を目指した X-JigSAP (Jigsaw-Shaped Self-Assembling Peptide)の開発

2.1.1 亜急性期脳梗塞の臨床応用を目指した X-JigSAP (Jigsaw-Shaped Self-Assembling Peptide)の開発

C 末端側に、疎水性表面が凹凸を持つ jigSAP に化学合成により生理活性物質 X を融合させたペプチドを人工合成し、アミノ酸分析によりペプチド配列と含量を決定した。結果、ペプチド配列は X-JigSAP であり、含量 94% と確認できた。

次に、この生理活性物質 X としての活性を保持していることを確認するために、X に対する受容体の安定発現株を用いて X-JigSAP の活性を確認した。結果、X-JigSAP は生理活性物質 X の活性を保持していることが確認され、X と同様の活性として X-JigSAP を治療研究に用いることを決定した。

2.1.2 生理活性物質 X-JigSAP を用いたマウス脳梗塞モデルの治療効果検討

X-JigSAP が X と同様の生理活性を保持していることを踏まえ、JigSAP を亜急性期脳梗塞マウスモデルの治療効果検討を行った。治療効果は歩行機能解析により、マウスの歩行失敗を測定した。X-JigSAP 導入群、下図の様に投与 1 週間後の歩行機能解析において JigSAP のみを投与し

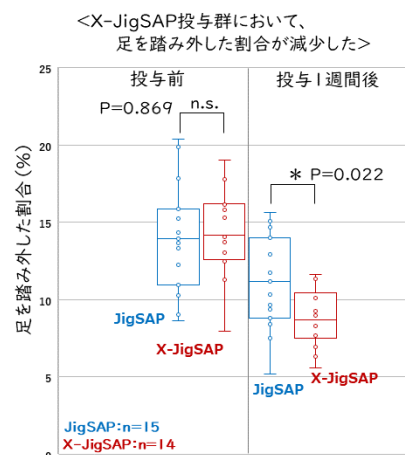


図 1 : X-JigSAP 投与後の足を踏み外した回数.

(左)X-JigSAP 投与前の全歩行数に対する歩行失敗の割合のグラフ.

(右)X-JigSAP 投与 1 週間後の全歩行数に対する歩行失敗の割合のグラフ.

た群と比較して足を踏み外した割合が減少し、生理活性物質 X-JigSAP による脳梗塞機能回復が示された(図 1)。次に、その治療効果を最大に発揮するよう、投与部位の検討を行った。投与部位は、脳表面に加えて下図に示す 4 種類の、大脳皮質、脳室、髄腔、静脈の、併せて 5 つの投与部位(投与方法)から検討した (図 2)。

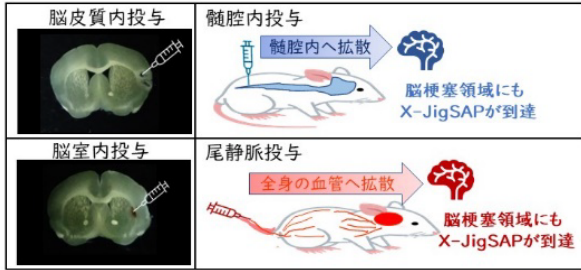


図 2: X-JigSAP 投与部位の模式図。(左上)脳室内投与の投与部位を模式的に表した画像。(左下)脳室内投与の投与部位を模式的に表した画像。(右上)髄腔内投与の投与部位と拡散の予測を模式的に表した画像。(右下)尾静脈投与の投与部位と拡散の予測を模式的に表した画像。

脳表面、脳皮質内、脳室内投与は、マイクロマニピュレーター(SM-15, Narishige, Tokyo Japan)を用いて 0.5mm 単位の精度で針位置を調整し、油圧ポンプ (MO-10, Narishige, Tokyo Japan) により緩やかかつ確実に X-JigSAP を目的位置へ投与した。髄腔内投与はマウス背部の皮膚を切開し、腰椎椎間より髄腔内へ注射針を挿入して投与した。尾静脈投与は尾の静脈より投与した、髄腔内等と尾静脈投与は拡散により脳梗塞領域に X-JigSAP が到達する。

髄腔内投与と尾静脈投与は直接脳へ投与するよりも、既に損傷している梗塞周辺への侵襲が少ないため、拡散により濃度が低くてもその効果が期待されたが、亜急性期のマウスモデルに X-JigSAP を投与して 7 日後の運動機能評価では、直接損傷部位近傍の大脳皮質への投与した場合に、治療効果が最大になった(図 3)。

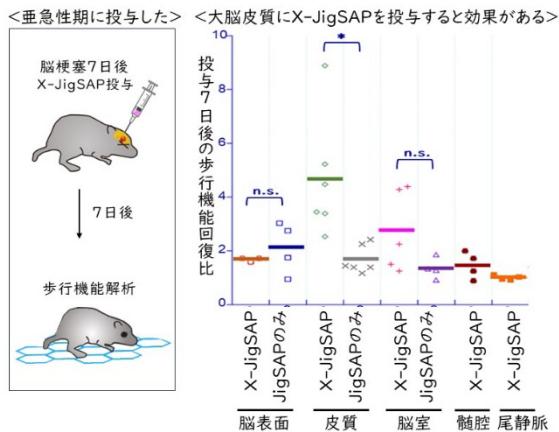


図 3: 投与部位による X-JigSAP の効果。(左) 亜急性期投与から歩行機能解析までの模式図。(右) 各投与部位における X-JigSAP 投与 7 日後の歩行機能回復比。

2.2 脳損傷メカニズムの解明

2.2.1 抗炎症性サイトカイン IL10 融合 JigSAP の作製と活性測定

抗炎症性サイトカイン IL10 の遺伝子配列を脾臓よりクローニングし、JigSAP の遺伝子配列と連結させてプラスミドベクターを構築することにより、IL10-JigSAP の発現ベクターを得た。作成した発現ベクターを 293T 細胞に形質転換し、293T 細胞が発現した IL10-JigSAP リコンビナントタンパク質を得た。得られた IL10-JigSAP リコンビナントタンパク質は、MC/9 細胞を用いて生理活性を確かめ、活性濃度の調整を行った。

2.2.2 急性期脳梗塞モデルマウスにおける IL10-JigSAP の作用効果検討

まず、急性期脳梗塞モデルマウスに抗炎症性サイトカインの IL10 を投与し、1 週間徐放させた。その後、脳梗塞部位の微小領域を採取し、qPCR により TNF α と IL6 の RNA 量を調査することにより、炎症反応の程度を評価した。結果、IL10-JigSAP の 1 週間の徐放により、脳梗塞部位において炎症を低下させることに成功した(図 4)。

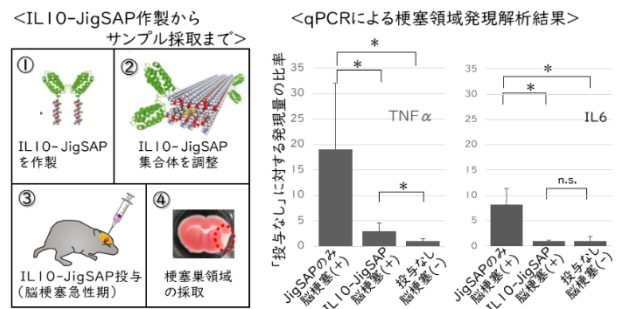


図 4: IL10-JigSAP 投与による炎症低下。(左) IL10-JigSAP 作製から梗塞巣採取までの模式図。(右) 梗塞巣組織の qPCR による発現解析結果。

次に、抗炎症性サイトカイン IL10 による炎症低下と運動機能回復の関係歩行機能解析により評価した。

この JigSAP を融合させた抗炎症性サイトカイン IL10 を持続的に投与したマウスの運動機能回復は下グラフの結果の通り、回復が遅延した。すなわち、炎症性サイトカインの抑制によって、脳梗塞マウスの歩行機能回復が遅延したことから、脳梗塞亜急性期の運動機能回復には急性期の炎症反応の維持が必要ということが本研究により示唆された。

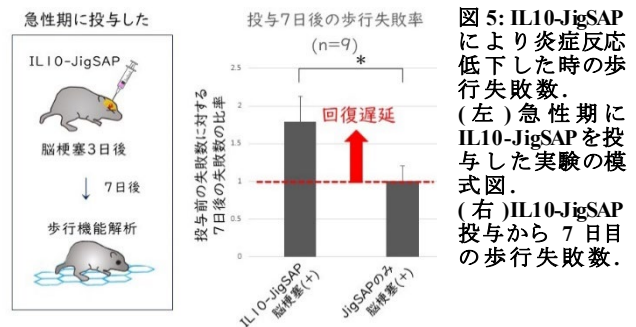


図 5: IL10-JigSAP により炎症反応低下した時の歩行失敗数。(左) 急性期に IL10-JigSAP を投与した実験の模式図。(右) IL10-JigSAP 投与から 7 日目の歩行失敗数。

脳梗塞の障害部位で、周辺の血管からの栄養が途絶え、加えて炎症反応が起こっている状況において、神経回路の機能修復や維持は困難だと考えられる。損傷脳メカニズム解明研究で、JigSAP を IL-10 を徐放させて体内の局所における免疫機能を持続的に低下させるために応用した。これは JigSAP の応用を進展させた成果である。

3. 今後の展望

今年度、生理活性物質 X-JigSAP が臨床応用可能で脳梗塞亜急性期治療に効果があることを示し、投与部位は損傷部位極近傍の大脳皮質でその効果が最大である結果を得た。今後、X-JigSAP の投与量と治療効果の相関を評価し、投与量を決定したい。

JigSAP による亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けた

形態学的定量解析系の確立

「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

秋本 沙織

1. はじめに

2022 年度より、KSP に設置した超高解像共焦点顕微鏡 (LSM900 AiryScan2, Zeiss) と三次元画像解析ソフト (Imaris, Zeiss) を用いて、脳梗塞後の損傷再生メカニズムを形態学的に評価・解明する方法の確立を試みてきた。

2022 年度は、血管分岐の程度を定量化するために、血管分岐間の平均距離を定量化するプロトコルを作製し、血管新生を定量評価することに成功した。2023 年度は神経細胞に着目し、脳梗塞後の神経細胞における樹状突起スパイン形成能の定量的解析手法を確立した。これについて、実験と結果を「2.(1) ニューロン樹状突起スパインの形態学的解析」に示した。

また、哺乳類の脳は、損傷後に失われた神経細胞を再生し機能を回復させる能力が非常に限られており、生体材料を用いて内因性神経幹細胞由来の神経芽細胞の遊走を促進できれば、損傷後の脳の回復を助ける新しいアプローチとなる。一方で、神経芽細胞の遊走を促進する足場、すなわち足場となる放射性グリア細胞が発生期に比べて少ないため、損傷部位まで神経芽細胞を遊走させることが難しい。そこで戦略的シーズ育成事業で開発した両親媒性ペプチド RADA16(A16G)(Ac-RADARADARADARADG-NH₂) (= mRADA) を使って、放射状グリア細胞表面に発現し、細胞遊走促進能を持つ N-カドヘリンの細胞外ドメインと mRADA の融合タンパク質 Ncad-mRADA を、人工放射状グリア足場として開発し、名古屋市立大学・澤本教授の研究室と共同で神経芽細胞の遊走促進効果を検討した。この研究では、Ncad-mRADA を mRADA ハイドロゲルと混合して脳組織深部に注入し、神経芽細胞の遊走促進に成功した。これについて、実験と結果を、「2.(2) ニューロン遊走を促進する超分子ペプチドの開発」に示した。

2. 実験と結果

(1) ニューロン樹状突起スパインの形態学的解析

神経細胞で黄色蛍光タンパク質 YFP が発現したマウス (Thy1-YFP マウス) を用いて、蛍光観察と画像解析を組み合わせで行った。まず脳組織深部までの可視化ができる 25 倍対物レンズ (LCI LD PlanApo chr, Zeiss) の広域観察により領域と神経線維を特定し (図 1 左)、次に 63 倍の高倍率レ

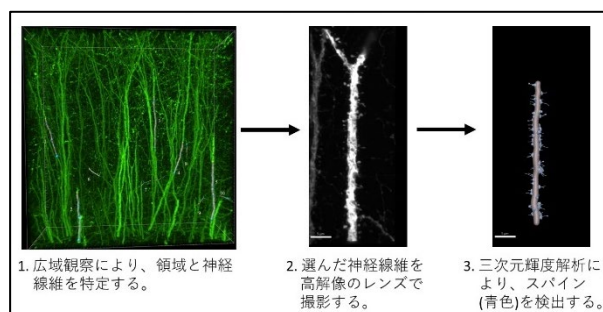


図 1: スパイン定量解析方法
広域観察により神経線維を特定し(左)、選んだ神経線維を高解像撮影する(中)、画像解析ソフトの三次元輝度解析により、スパインを検出する(右)。

ンズ (PlanApo chr, Zeiss) で神経線維 1 本を高解像に画像取得し (図 1 中)、そして得られた画像の三次元解析によりスパインの検出を行った (図 1 右)。条件検討の段階において、Thy1-YFP マウス神経細胞の蛍光輝度や神経線維の細さに対応できるパラメータを各段階において試行し、適切な条件を得ることに成功した。これにより、神経線維単位長さあたりのスパイン数を三次元の解析で算出する方法が確立できた。神経細胞間の新たな連絡経路となりうるスパインの形成能を定量化できる方法を確立したので、この方法で時空間的にスパイン形成能を評価することにより、損傷脳再生との相関が明らかとなる。

(2) ニューロン遊走を促進する超分子ペプチドの開発

我々は最もよく知られている超分子ペプチドゲル RADA (Ac-RADARADARADARADA-NH₂) の 1 つのアラニン残基をグリシンに置換することで、粘弾性などの物性を微調整できることを戦略的研究シーズ育成事業にて見出した。これまでに報告した RADA 変異体ペプチドの中で、本研究では、16 番目のアラニンをグリシンに置換した mRADA (Ac-RADARADARADARADG-NH₂) が、短く断片化した繊維を形成し、脳内投与に適した柔らかさを示すことから本 mRADA を選択した。まず、自己組織化した mRADA と RADA ペプチドを成体マウスの線条体に注射し、5 日後に固定した。その後、組織切片を作製してトルイジンブルー染色した。光学顕微鏡観察により、RADA は大きな凝集塊を形成し、脳実質領域と明瞭に区別された

(図 2 A)。一方、脳実質領域と mRADA ハイドロゲルの境界は不規則で不明瞭であり、これらの領域に多くの細胞が分布していた(図 2 B-B')。次に、透過型電子顕微鏡を用いて、脳実質領域における超分子ペプチドゲルの生体内構造を検討した。その解析の結果、RADA ハイドロゲルは注入箇所に沿って顕著に観察されたが(図 2 C-C')、様々な形態をもつ mRADA ハイドロゲルが注入箇所とその周辺に広く分布していた(図 2 D-D')。mRADA 線維の一部は血管や常在神経細胞やグリア細胞と結合しており、mRADA ペプチドの 1 回の注入で脳の広い範囲に細胞遊走の足場を提供できることが示された。

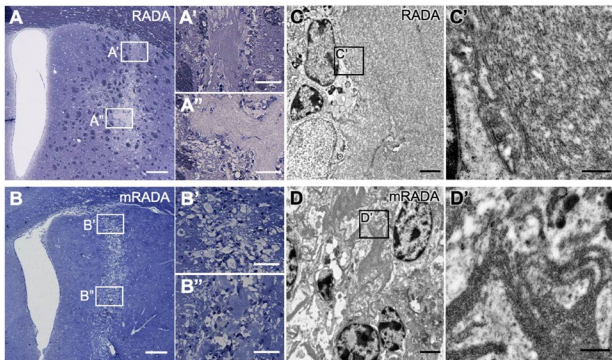


図 2: マウスの脳に注入された RADA および mRADA ペプチドのハイドロゲル形成
脳注入 5 日後の線条体における RADA(A) および mRADA(B) ハイドロゲルの形成を示す。A', A'', B' および B'' は A および B の枠で囲んだ部分の高倍率像である。線条体における RADA (C) および mRADA (D) ハイドロゲルの電子顕微鏡像。C' と D' は C と D の枠で囲んだ部分の高倍率画像。および D の枠で囲んだ部分の高倍率画像を示した。

そこで、mRADA タグ付き EGFP(EGFP-mRADA) を作製し、mRADA ハイドロゲルからの取り込みと放出を調べた。予想通り EGFP-mRADA はタグなし EGFP に比べて多く取り込まれた(図 3 A)。EGFP-mRADA の経時的放出アッセイでは、EGFP-mRADA のほとんどが 2 週間のインキュベーション後も mRADA ハイドロゲル中に残存した (図 3 B)。

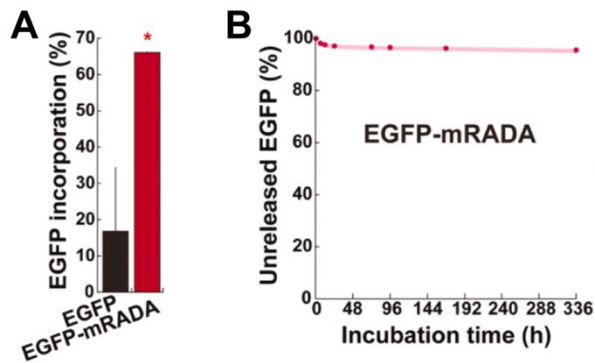


図 3: mRADA のペプチド付きタンパク質取り込み (A) 非タグ EGFP と mRADA タグ EGFP の取り込み比 (B) 未放出 EGFP と取り込まれた EGFP の比率

次に、発現プラスミドを用いて、N-カドヘリン細胞外ドメインに mRADA 配列を付加した Ncad-mRADA をコードするプラスミドベクターを構築した。HEK293T 細胞に、このプラスミドを遺伝子導入し、Ncad-mRADA タンパク質を得た。レオロジー測定から、Ncad の mRADA への組み込みは mRADA のハイドロゲル化特性に影響を与えないことが示された。EGFP-mRADA の場合と同様に、Ncad-mRADA は効率的に mRADA ハイドロゲルに取り込まれ、2 週間インキュベートした後も残存した。以上の結果から、Ncad-mRADA は mRADA ハイドロゲルと安定に結合することが示唆された(図 4)。

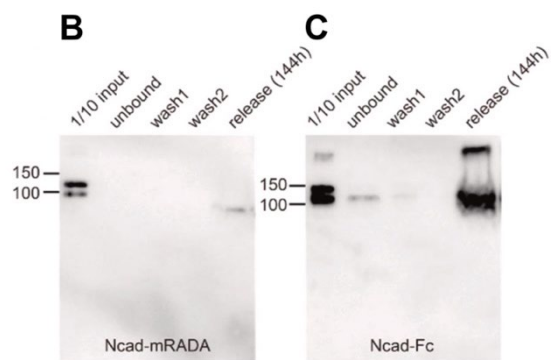
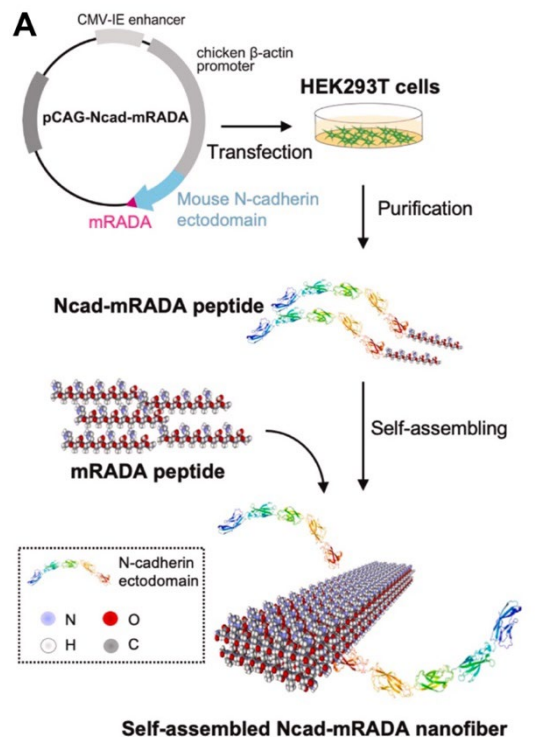


図 4: Ncad-mRADA ファイバー作製のスキーム (A) N-カドヘリン細胞外ドメイン配列に結合した mRADA ペプチドをコードするプラスミドを構築した。293T 細胞に Ncad-mRADA 発現プラスミドをトランスフェクトした。精製し濃縮した Ncad-mRADA タンパク質を mRADA とインキュベートして、Ncad-mRADA を mRADA に取り込ませた。(B,C) 2 週間かけて放出した Ncad-mRADA(B) と Ncad-Fc(C) をウェスタンブロットにて評価。ほとんどの Ncad-mRADA は 2 週間後もゲルから放出されずにゲルにとどまっていた。

この開発した Ncad-mRADA を用いて、名古屋市立大学澤本教授の研究室と共同で神経芽細胞の遊走を試みた。この研究では、Ncad-mRADA を mRADA ハイドロゲルと混合して脳組織深部に注入し、神経芽細胞の移動の促進に成功した。

これらの結果は、自己集合化した Ncad-mRADA が、内因性足場細胞の機能と構造の両方を模倣することを示したものであり、再生治療のための新しい戦略として発展させられる。

3. 今後の展望

今年度の研究で開発した、樹状突起スパインの定量評価系を活用して、スパインと歩行機能との関連を検討する。また、Ncad-mRADA を mRADA ハイドロゲルと混合して脳組織深部に注入し、神経芽細胞の移動を促進した手法は、我々が開発したペプチドゲルの新たな応用として神経科学領域の研究へ大きな波及効果が期待される。現在、脊髄損傷への応用を国内の研究者と共同研究にて進めている。

業績

【原著論文】

01. Yusuke Kawashima, Tomoyuki Hamachi, Akio Yamauchi, Koki Nishimura, Yuma Nakashima, Saiya Fujiwara, Nobuo Kimizuka, Tomohiro Ryu, Tetsu Tamura, Masaki Saigo, Ken Onda, Shunsuke Sato, Yasuhiro Kobori, Kenichiro Tateishi, Tomohiro Uesaka, Go Watanabe, Kiyoshi Miyata, and Nobuhiro Yanai, “Singlet fission as a polarized spin generator for biological nuclear hyperpolarization”, *Nature Communications* (Vol. 14), 2023
02. Noriyuki Uchida, Yunosuke Ryu, Yuichiro Takagi, Ken Yoshizawa, Kotono Suzuki, Yasutaka Anraku, Itsuki Ajioka, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi, Norihisa Hoshino, Tomoyuki Akutagawa, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato, Yuji Higuchi, Hiroaki Ito, Masamune Morita, Takahiro Muraoka, “Endocytosis-like Vesicle Fission Mediated by a Membrane-Expanding Molecular Machine Enables Virus Encapsulation for in vivo Delivery”, *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 145), 2023
03. Keiko Hiratsuka, Tatsuya Muramatsu, Takuya Seki, Christoph Weder, Go Watanabe, Yoshimitsu Sagara, “Tuning the mechanoresponsive luminescence of rotaxane mechanophores by varying the stopper size”, *Journal of Materials Chemistry C* (Vol. 11), 2023
04. Yoshika Hara, Atsuya Yaguchi, Hirotsugu Hiramatsu and Takahiro Muraoka, “ROS-Triggered Gel-Sol Transition and Kinetics-Controlled Cargo Release by Methionine-Containing Peptides”, *ChemBioChem* (Vol. 23), 2022
05. Shunsuke Okada, Yosuke Matsumoto, Masaki Okumura and Takahiro Muraoka, “Oxidative Protein Folding Promotion by Imidazolyl-Conjugated Thiol”, *Chemistry Letters* (Vol. 52), 2023
06. Yuya Ohno, Chikako Nakajima, Itsuki Ajioka, Takahiro Muraoka, Atsuya Yaguchi, Teppei Fujioka, Saori Akimoto, Misaki Matsuo, Ahmed Lotfy, Sayuri Nakamura, Vicente Herranz-Pérez, José Manuel García-Verdugo, Noriyuki Matsukawa, Naoko Kaneko, Kazunobu Sawamoto, “Amphiphilic peptide-tagged N-cadherin forms radial glial-like fibers that enhance neuronal migration in injured brain and promote sensorimotor recovery”, *Biomaterials* (Vol. 294), 2023
07. Takashi Matsui, Eiji Kojitani, Taichi Takasawa, Arisa Suto, Ami Tamari, Go Watanabe, Yoshio Kodera, “Assessment of inconsistencies in the solvent-accessible surfaces of proteins between crystal structures and solution structures observed by LC-MS”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 640), 2022
08. Takeshi Serizawa, Saeko Yamaguchi, Moe Amitani, Sawa

Ishii, Hiromi Tsuyuki, Yukiko Tanaka, Toshiki Sawada, Izuru Kawamura, Go Watanabe, Masaru Tanaka, “Alkyl chain length-dependent protein nonadsorption and adsorption properties of crystalline alkyl β -celluloside assemblies”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 220), 2022

09. Hayato Nishino, Mai Kitamura, Shunsuke Okada, Ryosuke Miyake, Masaki Okumura, Takahiro Muraoka, “Cysteine-Based Protein Folding Modulators for Trapping Intermediates and Misfolded Forms”, *RSC Advances* (Issue 42) 26658-26664, 2022
10. G. Takamatsu, Y. Manome, J-S. Lee, K. Toyama, T. Hayakawa, C. Hara-Miyauchi, M. Hasegawa-Ogawa, C. Katagiri, T. Kondo, H. James Okano, M. Matsushita, “Generation of four iPSC lines from a family harboring a 1p36-35 haplotype linked with bipolar disorder and recurrent depressive disorder: Three-generation patients and a healthy sibling”, *Stem Cell Research* (Vol.64)102915, 2022
11. Yuichiro Takagi, Noriyuki Uchida, Yasutaka Anraku, Takahiro Muraoka, “Stabilization of bicelles using metal-binding peptide for extended blood circulation”, *Chemical Communications* (Vol.58)5164-5167, 2022

【総説】

01. Takahiro Muraoka and Itsuki Ajioka, "Self-assembling Molecular Medicine for the Subacute Phase of Ischemic Stroke", *Neurochem Res* (Vol.77), 2022
02. 村岡貴博, 「亜急性期脳梗塞治療効果を有するジグソ一型超分子ペプチドゲル」, *月刊バイオインダストリー* (Vol.39), 2022
03. Takahiro Muraoka, Tomohide Saio and Masaki Okumura, “Biophysical Elucidation of Neural Network and Chemical Regeneration of Neural Tissue”, *Biophysics and Physicobiology* (Vol.19), 2022
04. 内田紀之、村岡貴博, 「加速する脳再生治療」, *月刊化学* (Vol.77), 2022
05. Takahiro Muraoka and Itsuki Ajioka, “Self-assembling Molecular Medicine for the Subacute Phase of Ischemic Stroke” *Neurochem Res* (Vol.47)2488-2498,2022

【口頭発表】

01. 内田紀之、笠勇之助、松原輝彦、佐藤智典、安楽泰孝、村岡貴博
Photoresponsive Membrane Deformation for Highly Efficient Encapsulation of Biomacromolecules and Applications to in vivo Phage Display Method
日本薬学会 143 回年会, 2023 年 03 月, 札幌

02. 村岡貴博
速度論効果を利用する多段階蛋白質フォールディング促進
日本化学会第 103 回春季年会, 2023 年 03 月, 野田
03. 味岡逸樹
蛋白質の生体内局所放出ダイナミクス制御と脳梗塞治療への展開
日本化学会, 2023 年 03 月, 野田
04. 岡田隼輔、奥村正樹、村岡貴博
酵素匹敵活性を持つタンパク質フォールディング促進剤の開発
日本化学会第 103 回春季年会, 2023 年 03 月, 野田
05. 喜多村真衣、村岡貴博
チオール基近傍の電荷がジスルフィド結合を含むタンパク質の天然構造形成促進へ与える影響
日本化学会第 103 回春季年会, 2023 年 03 月, 野田
06. 矢口敦也、内田紀之、味岡逸樹、村岡貴博
超分子らせんファイバーを形成するペプチドの開発と生体接着性光制御
日本化学会第 103 回春季年会, 2023 年 03 月, 野田
07. 石坂龍、河北杏樹、内田紀之、村岡貴博
自己集合性ペプチドにより誘導されるチューブ状リン脂質膜の作成と膜曲率認識タンパク質の単分子観察への応用
日本化学会第 103 回春季年会, 2023 年 03 月, 野田
08. 内田紀之、笠勇之助、松原輝彦、佐藤智典、安楽泰孝、村岡貴博
Photoresponsive Membrane Deformation for Highly Efficient Encapsulation of Biomacromolecules and Its Application to in vivo Phage Display Method
日本化学会第 103 回春季年会, 2023 年 03 月, 野田
09. 吉澤憲、内田紀之、村岡貴博
リポソーム膜の融合を誘導する膜収縮分子機械の開発と細胞内送達技術への応用
日本化学会第 103 回春季年会, 2023 年 03 月, 野田
10. 山下有希乃、三浦恵理香、馬淵拓哉、村岡貴博
タンパク質フォールディング促進機能を有する液液相分離材料の開発
日本化学会第 103 回春季年会, 2023 年 03 月, 野田
11. 味岡逸樹
損傷脳の潜在的再生能力を探る
日本解剖学会, 2023 年 03 月, 仙台
12. 村岡貴博
膜変形分子機械の開発と生体内輸送への応用
令和 4 年度東北地区先端高分子セミナー, 2023 年 03 月, 仙台
13. 村岡貴博
Functional assembly of polypeptides for injured brain regeneration
ZOOMinar series on “Molecular Basis of Proteinopathies”, 2023 年 02 月, オンライン
14. Noriyuki Uchida, Yuichiro Takagi, Takahiro Muraoka
Design of Phospholipid Nanosheet Using Self-assembly of Peptide-based Surfactant
Gordon Research Conference, 2023 年 01 月, USA
15. 味岡逸樹
脳梗塞の再生医療を目指した超分子ペプチドゲル開発
第 1 回 発動分子科学サロン, 2022 年 12 月, 横浜
16. Shunsuke Sato, Barun Dhara, Daigo Miyajima, Go Watanabe
Structure Prediction of Organic Crystals Using Molecular Dynamics Simulation
The 17th Pacific Polymer Conference, 2022 年 12 月, ブリスベン
17. 味岡逸樹
Developing a self-assembling molecular medicine for ischemic stroke
ISN-APSN 2nd Online School "Modelling Brain Disorders", 2022 年 12 月, オンライン
18. 味岡逸樹
Molecular design and development of supramolecular peptide hydrogels promoting angiogenesis after ischemic brain stroke
第 44 回日本分子生物学会年会, 2022 年 12 月, 千葉
19. 原央子
Brain regeneration by Jigsaw-shaped Self-Assembling Peptide hydrogel (JigSAP)
第 44 回日本分子生物学会年会, 2022 年 11 月, 千葉
20. 矢口敦也・平松弘嗣・味岡逸樹・村岡貴博
高次構造転移特性を有する自己集合性ペプチドの開発と亜急性期脳梗塞治療への応用
第 31 回ポリマー材料フォーラム, 2022 年 11 月, 東京
21. 味岡逸樹
異分野融合が推進するバイオマテリアルの新展開
第 95 回日本生化学会大会, 2022 年 11 月, 名古屋
22. Atsuya Yaguchi, Hirotsugu Hiramatsu, Itsuki Ajioka, Takahiro Muraoka
Development of a novel gel-forming peptide with helix-to-strand transition capability for injured brain regeneration
The 16th Asian Textile Conference (ATC-16), 2022 年 10 月, オンライン
23. 關拓和、竹谷純一、岡本敏宏、渡辺豪
有機半導体分子が示す結晶多形を再現する分子動力学計算手法の確立
第 12 回 CSJ 化学フェスタ, 2022 年 10 月, 東京
24. 石井佐和、西村達也、前田勝浩、渡辺豪
外部刺激応答性らせん高分子の構造安定性に関する分子動力学的研究
第 12 回 CSJ 化学フェスタ, 2022 年 10 月, 東京
25. 喜多村真衣、村岡貴博
酸化的タンパク質フォールディングを促進するチオール化合物の開発と電荷効果
第 12 回 CSJ 化学フェスタ 2022, 2022 年 10 月, 東京

26. 吉澤憲、内田紀之、村岡貴博
膜融合を発現する分子機械を用いた光応答性ベシクルの開発と応用
第12回CSJ化学フェスタ2022, 2022年10月, 東京
27. 原良佳、味岡逸樹、村岡貴博
自己集合性ペプチドの親水部変換によるバイオ機能制御
第12回CSJ化学フェスタ2022, 2022年10月, 東京
28. 味岡逸樹
仕事と家庭の関係を相互排他的から相乗包括的にする挑戦
第81回日本癌学会学術総会, 2022年09月, 横浜
29. 味岡逸樹
Injured brain regeneration using supramolecular peptide hydrogels
第60回日本生物物理学会年会, 2022年09月, 函館
30. Go Watanabe
A Molecular Dynamics Study for Self-Assembling Soft Materials
OLC2021 Satellite Workshop, 2022年09月, 名護
31. Shunsuke Sato, Barun Dhara, Daigo Miyajima, Go Watanabe
Structure Prediction of Organic Crystals Using Molecular Dynamics Simulation
OLC2021 Satellite Workshop, 2022年09月, 名護
32. 伊藤良将、佐藤俊輔、關拓和、竹谷純一、岡本敏宏、渡辺豪
有機半導体結晶の高精度な構造予測手法の開発
第83回応用物理学会秋季学術講演会, 2022年09月, 仙台
33. 新田海統、庄子良晃、福島孝典、渡辺豪
高秩序・高配向性を有するトリプチセン薄膜の分子動力学シミュレーション
第83回応用物理学会秋季学術講演会, 2022年09月, 仙台
34. 關拓和、竹谷純一、岡本敏宏、渡辺豪
分子動力学計算による有機半導体が示す構造相転移の再現
第83回応用物理学会秋季学術講演会, 2022年09月, 仙台
35. 佐藤俊輔、Barun Dhara、宮島大吾、渡辺豪
分子動力学シミュレーションによる有機結晶の構造予測
第83回応用物理学会秋季学術講演会, 2022年09月, 仙台
36. 栗原三朗、佐藤俊輔、西川浩矢、荒岡史人、渡辺豪
強誘電ネマチック液晶の微視的挙動に関する分子動力学的研究
2022年日本液晶学会討論会, 2022年09月, オンライン
37. 村岡貴博、岡田隼輔、奥村正樹
多段階反応システムによるタンパク質フォールディング促進
第16回バイオ関連化学シンポジウム, 2022年09月, 名古屋
38. 石井佐和、露木弘美、芹澤武、渡辺豪
分子動力学計算による結晶性セルロース集合体に対するタンパク質の吸着ダイナミクス解明
第71回高分子討論会, 2022年09月, 札幌
39. 露木弘美、上田智也、西村慎之介、塩本昌平、村上大樹、田中賢、渡辺豪
生体親和性ポリマーブラシへのタンパク質吸着挙動に関する分子動力学的研究
第71回高分子討論会, 2022年09月, 札幌
40. Noriyuki Uchida, Ryu Yunosuke, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato, Yasutaka Anraku, and Takahiro Muraoka
Endocytosis-like Vesicle Fission by Membrane Expanding Molecular Machine Enabling Efficient Encapsulation of Huge Biomacromolecules
第71回高分子討論会, 2022年09月, 札幌
41. 野崎真衣、廣瀬大佑、西村達也、石井佐和、渡辺豪、前田勝浩
側鎖に光学活性アミド基を有する対称置換型ポリ(ジフェニルアセチレン)誘導体のコンホメーション変化
第71回高分子討論会, 2022年09月, 札幌
42. 矢口敦也、平松弘嗣、味岡逸樹、村岡貴博
組木型パッキングを構成する両親媒性ペプチドのゲル特性、精密構造解析と脳梗塞治療応用
第71回高分子討論会, 2022年09月, 札幌
43. 喜多村真衣、村岡貴博
チオール化合物への電荷付与が酸化的タンパク質フォールディング促進に与える効果
第71回高分子討論会, 2022年09月, 札幌
44. 岡田隼輔、奥村正樹、村岡貴博
酵素模倣型酸化的フォールディング促進剤による濃縮環境での多段階触媒システムの実証
第71回高分子討論会, 2022年09月, 札幌
45. 樋口元気、内田紀之、村岡貴博
液液相分離の制御に向けた水溶性ブロックポリマー
第71回高分子討論会, 2022年09月, 札幌
46. Takahiro Muraoka
Regulated folding and assembly of polypeptides for designing ECM-mimetic biomaterials
Protein Folding, Aggregation, Misfolding Disease, and Disease Crosstalk, 2022年09月, オンライン(韓国)
47. Itsuki Ajioka, Atsuya Yaguchi, Mio Oshikawa, Go Watanabe, Takahiro Muraoka
Jigsaw-shaped self-assembling peptide (JigSAP) hydrogels efficiently incorporate and release VEGF and promote brain regeneration
2022 ISN-APSN Meeting, 2022年08月, ホノルル
48. 三浦大輝、渡辺豪
分子動力学計算によるグルタミンペプチドの自己集合構造の解明

第 35 回北里バイオサイエンスフォーラム, 2022 年 08 月, オンライン

49. 露木弘美、上田智也、西村慎之介、塩本昌平、村上大樹、田中賢、渡辺豪

分子シミュレーションを用いた生体親和性材料へのタンパク質吸着挙動の解明

第 35 回北里バイオサイエンスフォーラム, 2022 年 08 月, オンライン

50. Go Watanabe, Mitsuo Hara, and Jun Yoshida

A Molecular Dynamics Study of Helical Columnar Liquid Crystals Based on Propeller-Shaped Metallomesogens
ILCC2022, 2022 年 07 月, オンライン

51. 味岡逸樹

JigSAP ペプチドを用いた 脳梗塞の分子集合体医薬の開発

第 4 回アカデミックフォーラム, 2022 年 07 月, 東京

52. Takahiro Muraoka

Neurochemistry from Supramolecular Chemistry,
Neuro2022, 2022 年 07 月, 沖縄

53. Itsuki Ajioka, Takahiro Muraoka, Go Watanabe

JigSAP (jigsaw-shaped self-assembling peptide) for regenerative medicine of the subacute phase of ischemic stroke

Neuro2022, 2022 年 06 月, 沖縄

54. 矢口敦也、朝倉哲郎、内藤晶、平松弘嗣、味岡逸樹、村岡貴博

蛋白質の効率的取込と徐放を実現する 超分子ファイバー形成ペプチドの開発と脳梗塞治療応用

2022 年繊維学会年次大会, 2022 年 06 月, オンライン

55. Noriyuki Uchida, Yunosuke Ryu, Teruhiko Matsubara,

Toshinori Sato, Yasutaka Anraku, Takahiro Muraoka,
Endocytosis-like Vesicle Fission by Membrane Expanding Molecular Machine

第 13 回日本生物物理学会 中国四国支部大会, 2022 年 05 月, オンライン

56. 矢口敦也、平松弘嗣、味岡逸樹、村岡貴博

高次構造転移特性を有する自己集合性ペプチドの開発と亜急性期脳梗塞治療への応用

第 71 回高分子学会年次大会, 2022 年 05 月, オンライン

【特許】

- (1) 国内特許出願 2 件