

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

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、「分子集合体医薬」への展開を実現する。また医薬品展開に加えて、細胞の足場材料となる「分子集合体材料」への展開も目指す。

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. 2023年度の研究目的

(1) 基本技術の紹介と研究開発のねらい

2021年度までに、短いアミノ酸からなり、中性でゲル化し、生理活性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。

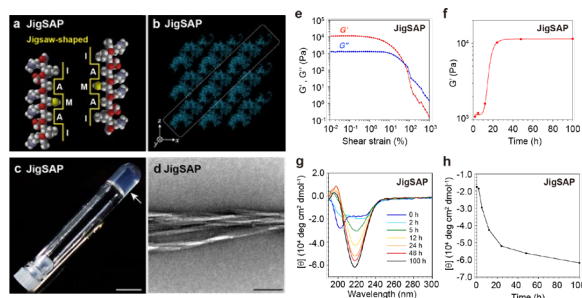
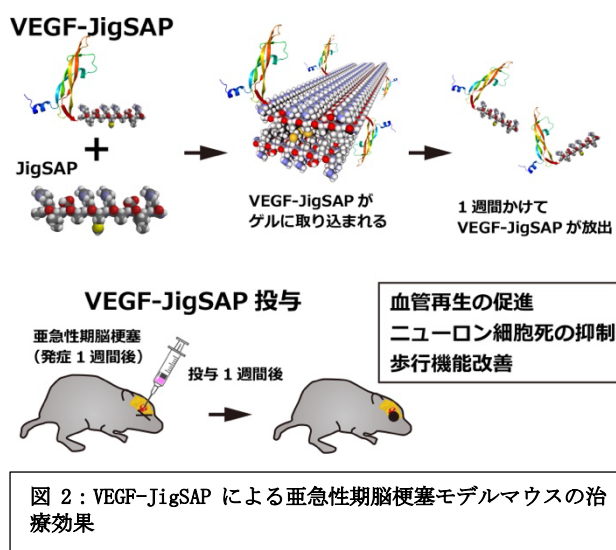


図1: JigSAPによるハイドロゲル形成

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℃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)。

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認し、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 2: Yaguchi et al., Nat Commun 2021)。



我々は独自開発した本技術を基盤に、抗体医薬治療や核酸医薬治療などの既存の治療モダリティ「分子治療」とは異なり、分子が集合化して機能を発揮する新しい治療モダリティ「分子集合体治療」を創出する。具体的には、分子医薬を投与局所で徐放させる「分子集合体医薬」と、移植細胞や培養細胞の足場材料として機能する「分子集合体材料」を開発する。「分子集合体治療」では様々な疾患が対象となり得るが、初期段階では特にアンメットメディカルニーズが多い中枢神経系疾患に焦点を当てる。

(2) 分子集合体医薬の創生

我々は VEGF-JigSAP にマウス脳梗塞モデルの治療効果があることを見出したが、VEGF による血管透過性亢進という副作用もあることから、VEGF 自体が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。そこで今年度は臨床応用に適した化学合成可能な生理活性物質 Z を用いて、臨床応用を目指した研究開発として展開した。

加えて、Z-JigSAP の有効性の信頼性を高めるため、大脳基底核まで広範な傷害を起こす中大脳動脈梗塞 (MCAO) モデルを確認した。また、歩行機能解析にお

いける評価者のバイアスと労力削減を目的とした自動化解析の確立にも着手した。

研究開発と並行して、本技術を基盤とした大学発スタートアップ起業を視野に入れ、事業開発の準備を進める。「分子集合体医薬」はパイプライン型を想定して準備を進める (図 3)。主要なパイプラインとなる脳梗塞では、第 1 相臨床試験または第 2 相臨床試験段階まで自社開発を進め、それ以降は製薬企業へ導出し、一時金、開発マイルストーン収入、ロイヤリティ収入を得る。公的研究機関との連携によって有望な対象疾患を見出されれば、パイプラインの追加を検討する。

「分子集合体医薬」

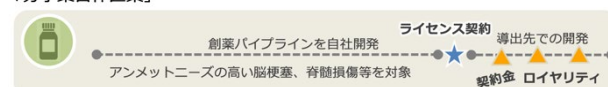


図 3: 分子集合体医薬のパイプライン型ビジネスモデル

(3) 分子集合体材料の創生

中枢神経系オルガノイドを用いた再生医療や創薬研究が注目を浴びている。一般的なオルガノイド作製時には、その 3 次元構造形成を補助して維持するために、細胞外マトリックス (ECM) が用いられる。オルガノイド作製に用いる ECM は、細胞接着性や、オルガノイドを立体的に支えるための機械強度等、様々な特性を備えていることが必要である。従来のオルガノイド作製技術では、マウス肉腫細胞に由来するマトリゲルや、動物組織から抽出されるコラーゲン等の天然 ECM がゲル化剤として主に用いられている。しかしながら、動物由来のゲル化剤は、分子量分布や成分組成が必ずしも均一ではなく、製造ロットごとの品質に差がある。また、生体内に導入される場合には、抽出物中に混入する微量成分やコンタミネーションによってアレルギーや未知の感染症を生じるリスクも避けることができない。また、異なる脳領域オルガノイドを組み合わせることで結合させるアセンブロイド培養や移植用組織として使用する場合、オルガノイド形成後に ECM を除去する必要がある。マトリゲルやコラーゲンの場合にはプロテアーゼ処理によりゲルを分解できるが、プロテアーゼ処理はオルガノイドの表面も同時に損傷してしまうことが避けられない。一方で、人工 ECM でもあるペプチドゲルは、アミノ酸側鎖の異なる特性を生かすことで分子集合体の構造制御が可能であり、精密かつ合理的な分子設計によりハイドロゲルの物理・化学的特性、すなわち、電荷状態、疎水性、細胞接着性、粘弾性、刺激応答などを調整することができる。

そこで今年度は、中枢神経系のオルガノイド培養に適した JigSAP を開発することを目的とした。はじめに網膜の 3 次元組織培養系をモデルに、ハイドロゲルの粘弾性が組織発生に与える影響を検討した。さらに、JigSAP ゲルを分解する 11 アミノ酸からなる Degradation (D)-JigSAP を開発した。

研究開発と並行して、事業開発の準備を進める。「分子集合体材料」はプラットフォーム型を想定して準備を進める（図 4）。JigSAP ペプチドを細胞足場として活用するビジネスであり、国内外の細胞治療を開発する再生医療スタートアップ企業や細胞培養スタートアップ企業等のニーズに合わせた分子集合体材料を開発して提供する。スタートアップ企業等の対象に応じた培養・動物モデルでの評価までの初期開発を、それら企業との共同研究開発として行うことで、短期的には、共同研究開発契約による契約一時金、研究開発マイルストーン収入を得る。非臨床試験以降は共同研究開発パートナーの企業が主体となって実施し、それら企業へライセンスアウトを行う。長期的には、ライセンス契約に伴う開発マイルストーン収入、ロイヤリティ収入を得る。細胞治療の発展・普及とともに事業規模を拡大していき、国外を含めた複数の共同研究開発を同時並行で進める。



図 4：VEGF-JigSAP による亜急性性期脳梗塞モデルマウスの治療効果

2. 2023 年度の研究成果

(1) 分子集合体医薬の創生

詳細は常勤研究員・原の研究成果にて記載するが、齧歯類脳梗塞モデルにおいて Z-JigSAP の治療効果を見出し、特許出願に至った（特願 2023-192464）。また、大脳基底核まで損傷領域が広く生じる中大脳動脈梗塞（MCAO）モデルマウス作製に成功し、歩行機能解析の精度向上と簡便化を図ることを目的とした 2 次元画像からの 3 次元姿勢推定に至るアルゴリズム確立に成功した。

以下はデータ未発表のため詳細は割愛するが、損傷脳再生メカニズムの解明においては、従来、神経機能回復には炎症シグナル抑制が重要だと考えられていたものの、急性期の炎症シグナルがその後の運動機能回復に重要だと示唆する研究成果を得た。さらに、静脈内および髄腔内投与を可能にする改変型 JigSAP の開発においては、体内投与に適した 2 種類のアニオン性の改変型 JigSAP、 α -helix 構造を示す JigSAP- α と β -sheet 構造を示す JigSAP- β の開発に成功した。

今後は、Z-JigSAP の治療効果を MCAO モデルでも確認し、有効性のデータを確固たるものにする。また、Z-JigSAP の投与最適濃度の決定、作用機序の解明を行う。作用機序解明では、Z-JigSAP 投与群とコントロール JigSAP 投与群での空間トランスクリプトーム解析や、JigSAP 単独投与による安全性／毒性試験も進め、臨床応用展開に向けた研究開発を進める。

(2) 分子集合体材料の創生

詳細は常勤研究員・秋本の研究成果にて記載するが、低融点アガロースを用いた胎仔網膜組織培養系において、ハイドロゲルの粘弾性が組織発生に与える影響を検討し、生体脳より弾性率が著しく低いアガロースゲルで培養した網膜組織では立体構造を保つことができず、網膜傷害時に発現増加するミューラグリアマーカーの遺伝子発現量が上昇することを見出した。一方で、同程度の弾性率を示すアガロースゲルでの培養では立体構造が維持され、ミューラグリアマーカーの遺伝子発現量上昇は認められず、生体脳と同程度の弾性率を示すゲル培養の重要性を見出した。

さらに、生体脳と同程度の弾性率を示す Culture (C)-JigSAP の開発に成功し、C-JigSAP の分解剤 Degradation (D)-JigSAP の開発に成功した（特願 2023-192489）。

今後は、今年度得られた材料設計指針を活かし、C-JigSAP を用いた多能性幹細胞由来の脳オルガノイド培養系の確立を目指す。また、中枢神経系以外の細胞種における C-JigSAP の足場材料としての効果も検討する。

分子集合体医薬の創生

「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

常勤研究員 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吸着／放出や増殖の制御などの様々な役割を担っている。損傷組織へ人工 ECM を埋植することで、修復細胞の足場機能に加えて、修復促進因子の放出源として機能すれば、損傷組織の再生や機能回復に有用と期待される。我々が開発した 11 アミノ酸からなる両親媒性ペプチド JigSAP (Jigsaw-Shaped Self-Assembling Peptide) は、膜貫通タンパク質グリコフォリン A の二量体形成ドメインを模倣した分子設計となっており、ペプチドの疎水面が凹凸形状を示す分子である。JigSAP は生理的 pH かつ炭酸イオン存在下で自己組織化して超分子ナノファイバーを形成し、ハイドロゲルとなって細胞足場として機能する。さらに、JigSAP を共有結合させた生理活性物質と過剰量の JigSAP を混合することで、JigSAP 結合物質はゲルに取り込まれた後、徐々に放出される性質を持つことから、投与した局所で生理活性物質を徐放する革新的ペプチドゲルである (Yaguchi et al., Nat Commun 2021 ; 17/999,313 (米国); EP21850578.2 (欧州); 特願 2022-539576 (日本))。

本プロジェクトでは、重度の脳梗塞発症から 1 週間程度経過した亜急性期の脳梗塞に対する革新的治療法開発を目指している。有望シーズ展開事業において、血管新生能を持つ血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) と JigSAP を混合した VEGF-JigSAP を、脳梗塞発症 1 週間後のモデルマウス脳内に単回注入することで、歩行機能の改善を見出した (Yaguchi et al., Nat Commun 2021)。しかしながら、VEGF による血管透過性亢進という副作用もあることから、いまだ VEGF が臨床応用されていない。また、VEGF が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。そこで今年度は臨床応用に適した化学合成可能な生理活性ペプチド Z を用いて、臨床応用を目指した研究開発として展開した。

加えて、Z-JigSAP の有効性の信頼性を高めるため、dMCAO モデルとは異なる脳梗塞モデルにおける治療効果を検討するため、大脳基底核まで広範な傷害を起こす中大脳動脈梗塞 (MCAO) モデルを確立した。また、評価者のバイアスと労力削減を目的とした歩行機能解析の自動化にも着手した。

2. 実験と結果

(1) Z-JigSAP の開発

血管新生能を持つ生理活性ペプチド Z は N 末端側に活性ドメインを持つため、既に報告済みの C 末端に JigSAP を共有結合した VEGF-JigSAP とは異なり、C 末端側に JigSAP を共有結合させた。データは割愛するが、Z-JigSAP は JigSAP を結合していない生理活性ペプチド Z と同等の活性を持つことを確認した。そこで、我々が確立済みの中大脳動脈遠位部梗塞 (dMCAO) モデルの発症 1 週間後に Z-JigSAP を脳内に単回投与し、投与 1 週間後に歩行機能を解析した。その解析の結果、Z 単独投与では歩行機能改善効果が認められなかったが、Z-JigSAP 投与群では改善効果が認められた (図 1)。齧歯類脳梗塞モデルにおいて Z-JigSAP の治療効果を見出したことで、特許出願に至った (特願 2023-192464)。

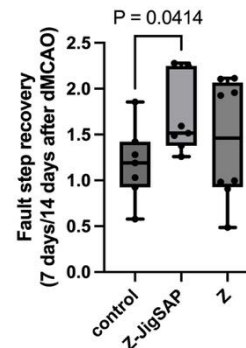


図 1 : Z-JigSAP 投与による歩行機能回復。
dMCAO モデル作製 7 日後に歩行機能テストを行い、足の踏み外し割合を算出した。歩行機能テスト直後に Z-JigSAP を脳内に投与し、さらに 7 日後 (脳梗塞 14 日後) に 2 回目の歩行機能テストを行った。Y 軸は歩行機能の回復度を示したもので、「7 日後の足の踏み外し割合 / 14 日後の足の踏み外し割合」として算出した。

(2) 中大脳動脈梗塞 (MCAO) モデルの確立

これまで、損傷脳再生メカニズムの解明のために、中大脳動脈遠位部梗塞 (dMCAO) モデルマウスを用いてきた。再生メカニズム解明の手掛かりになる損傷中心部とペナングラ領域における遺伝子発現変動や経時変化の検知に注力する手法である。しかしながら、損傷領域が大脳皮質に限定しているため、行動異常が捉えにくいとい

う問題点があった。また、Z-JigSAP の有効性を確固たるものにするためには2種類以上のモデルで検討することが望ましい。そこで、本研究では、大脳基底核まで損傷領域が広く生じる中大脳動脈梗塞（MCAO）モデルマウス作製を試みた。具体的には、頸動脈から直径約 200 μm のファイバー（Dccol MCAO suture）を挿入して中大脳動脈（MCA）分岐域まで押し込み、血流を 60 分間止める方法で重度脳梗塞 MCAO モデルマウスを作製した。これまでの dMCAO モデルマウスと今回新たに作製した MCAO モデルマウスの損傷領域を比較したところ、MCAO モデルでは大脳基底核まで損傷部が拡大していることを確認した（図 2）。

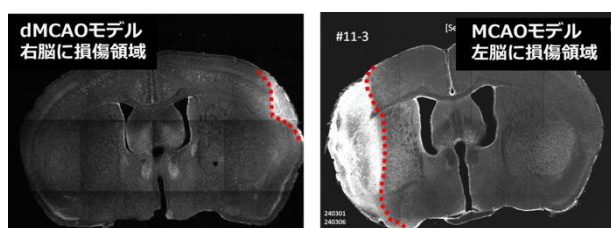


図 2：MCAO モデルの確立
dMCAO（左）および MCAO（右）モデル作製 7 日後に脳切片を作製し、ミクログリアマーカー Iba1 で免疫染色して損傷領域を可視化した。（左）dMCAO モデルでは大脳皮質特異的に傷害された。（右）MCAO モデルでは大脳皮質に加えて大脳基底核も傷害された。

(3) 歩行機能解析の自動化



図 3：歩行機能テスト
マウスを亀甲金網の上に置き、動画を撮影する。黄色の丸印で示した足の踏み外しを観測者が BORIS ソフトウェア上で記録し、総歩数に対する足の踏み外し割合を算出する。

歩行機能テストでは、図 3 に示す亀甲金網の上にマウスを置き、10 分間自由歩行させ動画を撮影する。この動画から、マウスの総歩数と足を踏み外した歩数を観測者が BORIS ソフトウェア上で記録し、足の踏み外し割合を算出する。この解析の問題点は、観測者ごとに足の踏み外し基準が異なるため、基準となる対象群の計測を実験ごとに行う必要があり多大な労力を要する点である。また、行動解析実験全般に当てはまるが、観測者が気づかない変化を抽出できない点も問題点として挙げる。そこで本研究では、足の踏み外しを物理量によって判別する技術を開発し、歩行機能解析の精度向上と簡便化を図る

ことを目的とした。

はじめに、実験環境を包括的に再現した仮想環境で複数の合成データを作成し、そのデータをトレーニングデータとして使用した。具体的には、歩行機能テストの実験環境を仮想環境で再現し、3 次元空間内の物体が手前の物体で隠れるオクルージョンが多くなるマウスの合成データセットの作成と、2 次元および 3 次元姿勢推定の精度の比較を行った。2 次元姿勢推定では YOLOv8-Pose を用いて複数の合成データセットを使用し、CG で作成したテストデータと実際の実験の画像で精度の比較を行った。3 次元姿勢推定には複数視点からレンダリングした合成データセットを用いて三角測量による推定値の評価を行った。学習データを作成する際には、Unreal Engine 5.3 を使用して描画と基準データの生成を行った。また、汎用性を高めるため、背景色やマウスの位置・回転、亀甲金網の位置・回転、カメラの位置・回転などの要素をランダムに設定できるようにした。マウスの重要な基準点を図 4 に示した。

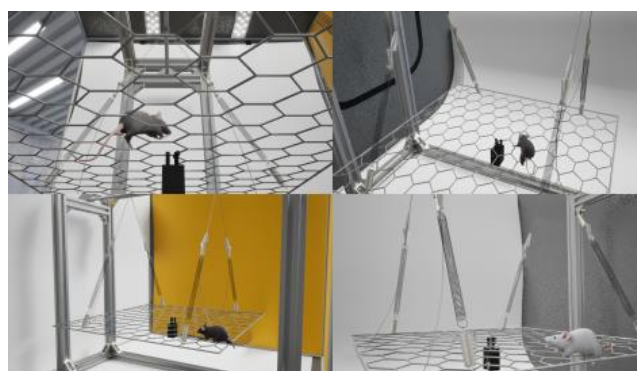
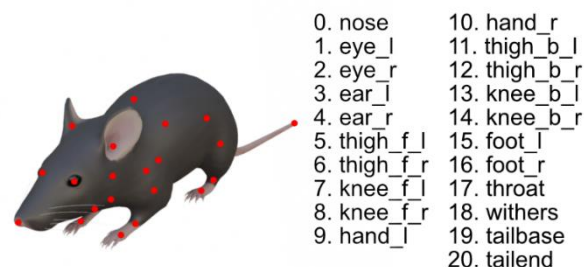


図 4：機械学習のための合成データセット作成
（上）基準点の設定（下）Unreal Engine 5.3 でレンダリングされた教師データの例

作成した教師データを使用して姿勢推定モデルの学習を行った。YOLOv8-Pose を使用し、事前学習された姿勢推定モデルに対して、複数の教師データを使用したファインチューニングを行った。図 5 に 2 次元姿勢推定のテストデータの結果を示すが、適合率が 81.1% と算出され、良好な結果を得た。次に 3 次元姿勢推定を行った。4 視点から撮影した CG 画像計 36 枚からなるテストデータに対し、上記データセットにより学習させたモデルを使用し、Isakov らの手法による三角測量を実行した

(Karim Isakov et al., Proc ICCV 7718-7727, 2019)。推定座標と正解座標の距離の平均 MPJPE を算出して精度を算出した結果、CG データセットに対し平均誤差 7 mm 以内の推定値という良好な結果を得ることに成功した。

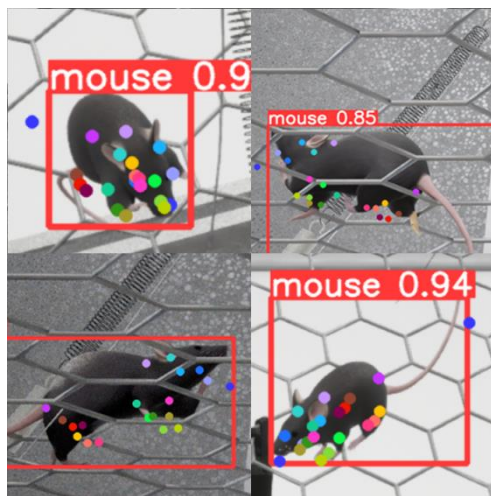


図 5：姿勢推定解析
背景色やマウスの位置・回転、亀甲金網の位置・回転、カメラの位置・回転などの要素を加えた適合率の測定

3. 今後の展望

Z-JigSAP の治療効果を MCAO モデルで確認し、有効性のデータを確固たるものにする。また、Z-JigSAP の投与最適濃度の決定、作用機序の解明を行う。JigSAP 単独の安全性および毒性試験も進め、臨床応用展開に向けた研究開発を進める。

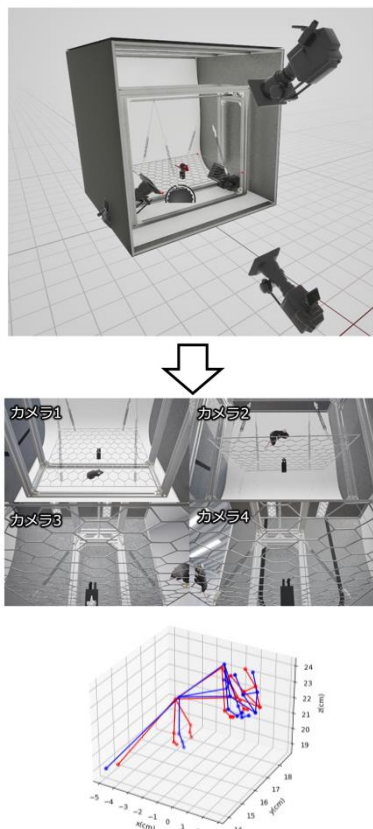


図 6：3次元姿勢推定
(上・中) 4 視点から撮影した CG データを用いて解析した (下) 姿勢推定の精度評価 (青線：正解座標、赤線：推定座標)

分子集合体材料の創生

「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

常勤準研究員 秋本 沙織

1. はじめに

中枢神経系オルガノイドを用いた再生医療や創薬研究が注目を浴びている。一般的なオルガノイド作製時には、その3次元構造形成を補助して維持するために、細胞外マトリックス (ECM) が用いられる。オルガノイド作製に用いる ECM は、細胞接着性や、オルガノイドを立体的に支えるための機械強度等、様々な特性を備えていることが必要である。従来のオルガノイド作製技術では、マウス肉腫細胞に由来するマトリゲルや、動物組織から抽出されるコラーゲン等の天然 ECM がゲル化剤として主に用いられてきた。しかしながら、動物由来のゲル化剤は、分子量分布や成分組成が必ずしも均一ではなく、製造ロットごとの品質に差が問題点となっている。また、生体内に導入される場合には、抽出物中に混入する微量成分やコンタミネーションによってアレルギーや未知の感染症を生じるリスクも避けることができない。また、異なる脳領域オルガノイドを組み合わせるアセンブroid培養や移植用組織として使用する場合には、オルガノイド形成後に ECM を除去する必要がある。マトリゲルやコラーゲンの場合にはプロテアーゼ処理によりゲルを分解するが、プロテアーゼ処理はオルガノイド自体も同時に損傷してしまうことが避けられない。一方で、人工 ECM でもあるペプチドゲルは、アミノ酸側鎖の異なる特性を生かすことで分子集合体の構造制御が可能であり、精密かつ合理的な分子設計によりハイドロゲルの物理・化学的特性、すなわち、電荷状態、疎水性、細胞接着性、粘弾性、刺激応答などを調整することができる。最近我々は、世界に先駆けて、吸着したタンパク質をゲル局所で放出するペプチドゲル JigSAP を開発し、JigSAP を共有結合した VEGF との融合タンパク質 VEGF-JigSAP を脳内に投与することで、マウス亜急性期脳梗塞モデルの機能回復効果があることを見出した (Yaguchi et al., Nat Commun 2021 ; 17/999,313 (米国); EP21850578.2 (欧州); 特願 2022-539576 (日本))。本発明の特徴は、11 個のアミノ酸 JigSAP 配列を共有結合した機能性タンパク質に過剰量の JigSAP と混合して体内投与すると機能性タンパク質が 1 週間程度かけて放出される点である。

そこで本研究では、中枢神経系のオルガノイド培養に適した JigSAP を開発することを目的とした。はじめに網膜の3次元組織培養系をモデルに、ハイドロゲルの粘弾性が組織発生に与える影響を検討した。さらに、JigSAP ゲルを

分解する 11 アミノ酸からなる Degradation (D)-JigSAP を開発した。

2. 実験と結果

(1) 網膜組織3次元培養に対するゲル弾性率の影響

マウスから摘出した脳 (Brain) と、オルガノイド培養で一般的に用いられている天然 ECM コラーゲンゲル (Collagen gel) とマトリゲル (Matrigel) の機械強度を検討するために、それぞれのサンプルの動的粘弾性測定を行った (図 1)。その解析の結果、コラーゲンゲルやマトリゲルに比べて、生体脳のせん断弾性率 (G') の値が 10 倍以上高く、より高い機械強度を示すことが明らかとなった。

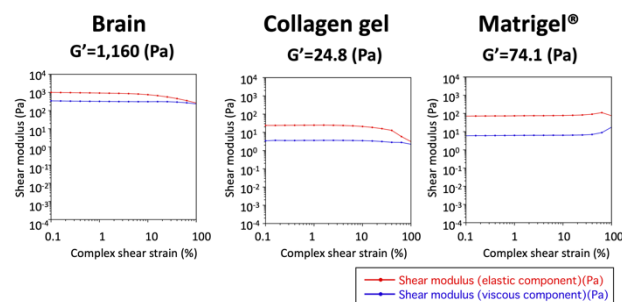


図 1 : マウス脳組織の動的粘弾性測定
マウス生体脳組織は汎用培養ゲルより高い弾性率を示した。

そこで、中枢神経組織の3次元ゲル培養における弾性率の差異の影響を検討するために、さまざまな弾性率を示すアガロースゲルを作製した。まず、ゲル化する低融点アガロース (SeaPlaque GTG Agarose) の濃度を検討し、約 0.1% の濃度でゲル化することを確認した (図 2)。

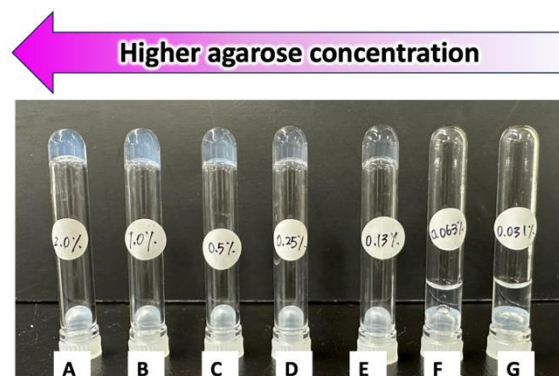


図 2 : アガロースゲルの調整

低融点アガロース (SeaPlaque GTG Agarose)を用いてゲル化濃度を検討した。0.13%以上の濃度でゲル化した。A: 2.0%, B: 1.0%, C: 0.50%, D: 0.25%, E: 0.13%, F: 0.063%, G: 0.031%

それぞれの濃度における動的粘弾性測定を行い、本研究では生体脳組織よりも機械強度の高い2%と若干低い0.5%、汎用ゲルと同程度の0.1%のアガロースゲルの3種類を用いて検討することにした(図3)。

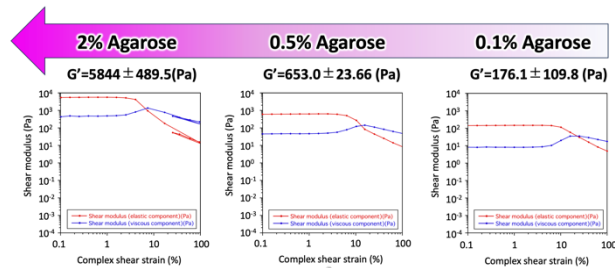


図 3 : アガロース濃度の調整による弾性率の制御

胎生 14 日目のマウスレンズと網膜を含む組織を単離し、異なる弾性率を示すアガロースゲルに網膜組織を包埋して 17 日間メンブレン培養を行った(図4上)。培養後に凍結切片を作成し、視細胞マーカーの Recoverin とレンズマーカーの CRYAB で免疫染色した。いずれの条件下でも生体網膜と同様の網膜層構造を認めたが、0.1%アガロースで培養した網膜組織は球状形態を保持せず、潰れた形状を示した(図4下)。

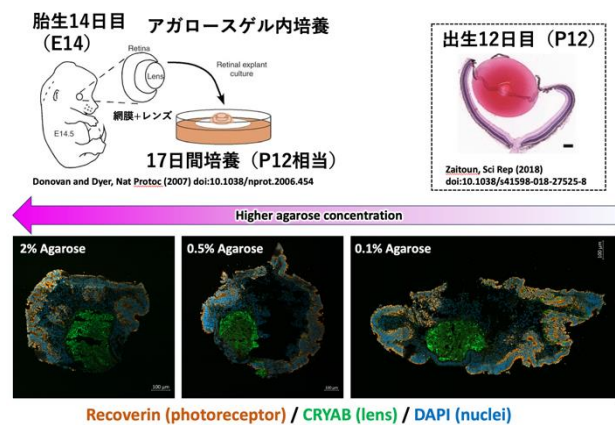


図 4 : 弾性率の違いによる培養立体組織の形状の違い
(上) 実験方法: 胎生 14 日目のレンズと網膜を単離し、アガロースゲルに包埋して 17 日間組織培養した。培養後の組織の凍結切片を作製し、Recoverin と CRYAB で免疫染色した。(下) 凍結切片の免疫組織染色像

次に細胞分化に対する影響を検討するため、Q-PCR 解析にて視細胞 (Recoverin)、ミュラーグリア (Glutamine synthetase)、未分化細胞 (Nestin)、双極細胞 (PKCα)、ア

マクリン/水平細胞 (Calbindin) のマーカー遺伝子発現を検討した(図5)。いずれの条件でも培養下でも個体発生と同様に網膜分化は進行したが、出生 12 日目の生体網膜組織 (P12) に比べ、2%ゲルでは視細胞マーカーの低下が認められ、0.1%ゲルではミュラーグリアマーカーの上昇が認められた。また、いずれの条件でも抑制性神経細胞マーカーの低下が認められた。

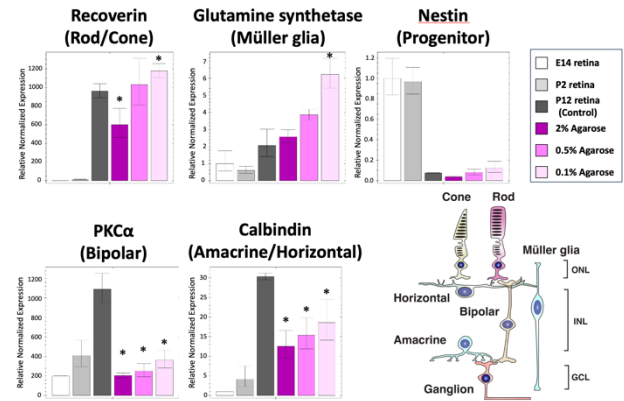


図 5 : 弾性率の違いによる遺伝子発現の違い

胎生 14 日目 (E14)、出生 2 日目 (P2)、および出生 12 日目 (P12) の網膜、2%、0.5%、0.1%アガロース 17 日間培養した組織から RNA を抽出し、Q-PCR 解析を行った。P12 網膜をコントロールとした。* $p < 0.05$ (P12 生体網膜との比較)

汎用ゲルと同程度の弾性率を示す 0.1%アガロースゲルで培養した培養組織は、球状形態を維持せず、網膜傷害時に発現増加するミュラーグリアの遺伝子発現量が上昇し、生体網膜よりも高い弾性率を示す 2%アガロースゲルで培養した組織では、視細胞の遺伝子発現量が低下したことから、粘弾性特性が *in vitro* 網膜発生に影響を与えることが明らかとなった。

(2) D-JigSAP の開発

脳内投与の実験では溶媒を加えてからゲル化するまでの時間が短すぎると投与しにくいという問題点があったが、ゲル培養では、ゲル化までの時間が短い方が好都合である。そこで我々は、培養用 JigSAP として 2 時間程度で硬くなる 11 アミノ酸からなる改変型 JigSAP を開発し、Culture-JigSAP (C-JigSAP) と名付けた。C-JigSAP の弾性

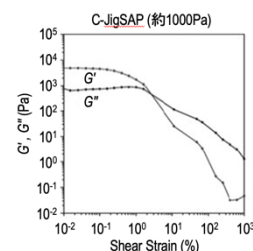


図 6 : C-JigSAP の動的粘弾性測定

率は約 1 kPa で、生体脳の弾性率と同程度であった(図 6)。

この C-JigSAP のゲル化に必要な不可欠となる分子間結合を同定するために、固体 NMR 解析で分子間結合ドメインを明らかにし、その結合に重要なアミノ酸に変異を加え、分子間結合を切断する 11 アミノ酸からなる Degradation (D)-JigSAP を開発した。C-JigSAP とは異なり、同条件で溶解した D-JigSAP はゲル化せず(図 7)、さらに興味深いことに、ゲル化した C-JigSAP に D-JigSAP を添加することで C-JigSAP ゲルが分解されることが明らかとなった。以上の結果から、我々は生体脳と同程度の弾性率を示す C-JigSAP の開発に成功し、C-JigSAP の分解剤 D-JigSAP の開発に成功した(図 8)(特願 2023-192489)。

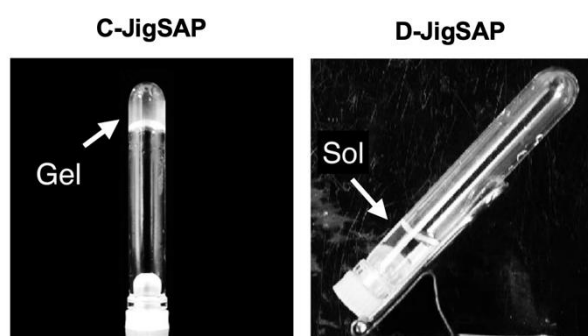


図 7 : (左) ゲル化した 1% C-JigSAP、(右) ゲル化しなかった 1% D-JigSAP

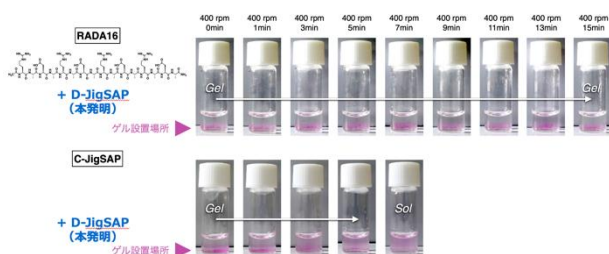


図 8 : (上) 1% RADA16 ゲルに D-JigSAP を加えた。
(下) 1% C-JigSAP に D-JigSAP を加えた。RADA16 や C-JigSAP は赤く着色した。

3. 今後の展望

今年度はハイドロゲルのキャラクタリゼーションを網膜組織の立体培養系を中心に進めてきたが、今後は多能性幹細胞由来の脳オルガノイド培養にて解析を進める。また、中枢神経系以外の細胞種における C-JigSAP の足場材料としての効果も検討する。

業績

【原著論文】

（投稿掲載）

01. Qiming Liu, Tianyue Zhang, Yuka Ikemoto, Yudai Shinozaki, Go Watanabe, Yuta Hori, Yasuteru Shigeta, Takemi Midorikawa, Koji Harano, Yoshimitsu Sagara, "Grinding - Induced Water Solubility Exhibited by Mechanochromic Luminescent Supramolecular Fibers" , *Small* (2400063), 2024
02. Tomoya Enjou, Shimpei Goto, Qiming Liu, Fumitaka Ishiwari, Akinori Saeki, Taro Uematsu, Yuka Ikemoto, Sora Watanabe, Go Matsuba, Kouichiro Ishibashi, Go Watanabe, Satoshi Minakata, Yoshimitsu Sagara, Youhei Takeda, "Water-Dispersible Donor-Acceptor-Donor π - Conjugated Bolaamphiphiles Enabling Humidity-Responding Luminescence Color Change" , *Chemical Communications* (Vol.60), 3653-3656, 2024
03. Tomoyuki Hamachi, Koki Nishimura, Keita Sakamoto, Yusuke Kawashima, Hironori Kouno, Shunsuke Sato, Go Watanabe, Kenichiro Tateishi, Tomohiro Uesaka, Nobuhiro Yanai, "Triplet dynamic nuclear polarization of pyruvate via supramolecular chemistry" , *Chemical Science* (vol. 14), 13842-13850, 2023
04. Shunsuke Okada, Yosuke Matsumoto, Rikana Takahashi, Kenta Arai, Shingo Kanemura, Masaki Okumura, Takahiro Muraoka, "Semi-Enzymatic Acceleration of Oxidative Protein Folding by N-Methylated Heteroaromatic Thiols" , *Chemical Science* (Vol.14), 7630-7636, 2023
05. Go Watanabe, Akane Yamazaki, Jun Yoshida, "The Missing Relationship between the Miscibility of Chiral Dopants and the Microscopic Dynamics of Solvent Liquid Crystals: A Molecular Dynamics Study" , *Symmetry* (Vol. 15), 1092, 2023

【総説・概論】

（投稿掲載）

01. 味岡 逸樹, 村岡 貴博, "超分子ペプチドゲルの分子設計と分子集合体医薬への応用" , *細胞* (vol. 56), 98-102, 2024
02. Takashi Kato, Junya Uchida, Yoshiki Ishii, Go Watanabe, "Aquatic Functional Liquid Crystals: Design, Functionalization, and Molecular Simulation" , *Advanced Science* (vol. 11), 2306529, 2023
03. Noriyuki Uchida and Takahiro Muraoka, "Self-assembling materials functionalizing bio-interfaces of phospholipid membranes and extracellular matrices" , *Chemical Communications* (Vol.59), 9687-9697, 2023

【口頭発表】

01. 原 良佳, 矢口 敦也, 平松 弘嗣, 村岡 貴博
両親媒性ペプチドのメチオニン酸化に応答するゲルゾル転移 と物質放出制御への応用
第 72 回高分子学会年次大会, 2023 年 05 月, 高崎
02. 山下 有希乃, 三浦 恵理香, 馬淵 拓哉, 村岡 貴博
液液相分離を利用したタンパク質フォールディングの促進
第 72 回高分子学会年次大会, 2023 年 05 月, 高崎
03. 矢口 敦也, 内田 紀之, 味岡 逸樹, 村岡 貴博
生体接着性を光制御する螺旋状ファイバー形成ペプチドの開発
第 72 回高分子学会年次大会, 2023 年 05 月, 高崎
04. Noriyuki Uchida, Yuichiro Takagi, Takahiro Muraoka
Design of Phospholipid Membrane Supramolecular Nanosheets and Their Applications to Blood Administration
第 72 回高分子学会年次大会, 2023 年 05 月, 高崎
05. 矢口 敦也, 内田 紀之, 平松 弘嗣, 味岡 逸樹, 村岡 貴博
らせん状繊維へと自己組織化する生体接着性 ゲル化ペプチドの開発
2023 年繊維学会年次大会, 2023 年 06 月, 江戸川区
06. Kaito Nitta, Yoshiaki Shoji, Takanori Fukushima, Go Watanabe
Molecular Dynamics Simulation of Highly Ordered and Oriented Triptycene Thin Films
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023 年 06 月, シンガポール
07. Ryosuke Ito, Shunsuke Sato, Takuya Seki, Jun Takeya, Toshihiro Okamoto, Go Watanabe
Accurate Crystal Structure Prediction of Organic Semiconductors
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023 年 06 月, シンガポール
08. Daiki Miura, Noriyuki Uchida, Takahiro Muraoka, Go Watanabe
Molecular Dynamics Simulation Study on the Self-assembly Structures of Amphiphilic Peptides
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023 年 06 月, シンガポール
09. Saburo Kurihara, Hiroya Nishikawa, Fumito Araoka, Go Watanabe
A Molecular Dynamics Simulation Study to Investigate the Microscopic Behavior of Ferroelectric Nematic Liquid Crystals
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023 年 06 月, シンガポール

10. Shunsuke Sato, Barun Dhara, Daigo Miyajima, Go Watanabe
Structure Prediction of Organic Crystals Using Molecular Dynamics Simulation
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023 年 06 月, シンガポール
11. Go Watanabe, Ryosuke Ito, Shunsuke Sato, Takuya Seki, Jun Takeya, Toshihiro Okamoto
Computational Prediction of Dynamics and Structure of Organic Semiconductor Crystals
11th International Conference on Materials for Advanced Technologies, 2023 年 06 月, シンガポール
12. Atsuya Yaguchi, Noriyuki Uchida, Hirotsugu Hiramatsu, Itsuki Ajioka, Takahiro Muraoka
Development of a Helix-Forming Photoresponsive Peptide for Controlling Bioadhesion Property
The 16th SPSJ International Polymer Conference, 2023 年 07 月, 札幌
13. Ken Yoshizawa, Noriyuki Uchida, Takahiro Muraoka
Membrane-contracting Molecular Machine for Intracellular Delivery with Membrane Fusion
The 13th SPSJ International Polymer Conference, 2023 年 07 月, 札幌
14. Yoshika Hara, Atsuya Yaguchi, Hirotsugu Hiramatsu, Takahiro Muraoka
Kinetics Control of Gel-Sol Transition and Cargo Release of Oxidation Responsive Peptides
The 15th SPSJ International Polymer Conference, 2023 年 07 月, 札幌
15. Yukino Yamashita, Erika Miura, Mabuchi Takuya, Takahiro Muraoka
LLPS materials for protein capturing and manipulation
The 14th SPSJ International Polymer Conference, 2023 年 07 月, 札幌
16. 喜多村 真衣
Thiol Compounds Bearing Cationic Units Promote Oxidative Protein Folding
The 16th SPSJ International Polymer Conference, 2023 年 07 月, 札幌
17. 原 央子, 味岡 逸樹, 村岡 貴博
Brain regeneration by Jigsaw-shaped Self-Assembling Peptide hydrogel (JigSAP)
第 46 回日本神経科学大会, 2023 年 08 月, 仙台
18. 喜多村 真衣
濃縮条件でタンパク質フォールディングを促進するミセル形成チオール材料の開発
第 17 回バイオ関連化学シンポジウム, 2023 年 09 月, 野田
19. 森 圭太, 村岡 貴博
環状ポリアミン修飾チオール分子を利用した酸化的タンパク質フォールディング促進
第 17 回バイオ関連化学シンポジウム, 2023 年 09 月, 野田
20. 矢口 敦也, 味岡 逸樹, 平松 弘嗣, 村岡 貴博
亜急性期脳梗塞治療を目指した新規自己集合性ペプチドの開発と集積構造解析結果に基づくゲル化速度制御
第 17 回バイオ関連化学シンポジウム, 2023 年 09 月, 野田
21. 佐藤 俊輔, 前田 大光, 渡辺 豪
分子動力学シミュレーションによるノルコロール誘導体が形成するカラムナー液晶の構造解明
2023 年日本液晶学会討論会, 2023 年 09 月, 東京
22. 伊藤 良将, 佐藤 俊輔, 關 拓和, 竹谷 純一, 岡本 敏宏, 渡辺 豪
計算科学を基盤とした有機半導体結晶の高精度な構造予測手法の確立
第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 09 月, 熊本
23. 佐藤 俊輔, Barun Dhara, 宮島 大吾, 渡辺 豪
有機結晶の構造予測に向けた分子動力学計算による構造安定性の評価
第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 09 月, 熊本
24. 篠崎 雄大, 佐藤 俊輔, 關 拓和, 伊藤 良将, 竹谷 純一, 岡本 敏宏, 渡辺 豪
分子シミュレーションを用いた p 型有機半導体結晶の集合体構造予測
第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 09 月, 熊本
25. 新田 海統, 庄子 良晃, 福島 孝典, 渡辺 豪
分子動力学シミュレーションによる高秩序・高配向性を有するトリプチセン薄膜の形成機構解明
第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 09 月, 熊本
26. 森 圭太, 村岡 貴博
修飾チオール化合物による酸化的タンパク質フォールディング促進: 環状ポリアミン配位子の導入効果
錯体化学会第 73 回討論会, 2023 年 09 月, 水戸
27. 三浦 大輝, 村岡 貴博, 渡辺 豪
分子動力学シミュレーションによる両親媒性ペプチドの自己組織化構造に関する研究
第 84 回応用物理学会秋季学術講演会, 2023 年 09 月, 熊本
28. 味岡逸樹
超分子ペプチドゲルによる人工足場創製と損傷脳再生
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川
29. 喜多村 真衣
濃縮環境での酸化的タンパク質フォールディング促進を目指した材料開発
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川
30. 近藤 詩織, 内田 紀之, 村岡 貴博
超分子ファイバーを用いた液液相分離ドロプレットの安定化および光制御
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川

31. 山下 有希乃, 三浦 恵理香, 馬淵 拓哉, 村岡 貴博
液液相分離によるタンパク質の凝集抑制及びフォールディング促進
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川
32. 矢口 敦也, 内田 紀之, 平松 弘嗣, 味岡 逸樹, 村岡 貴博
構造可変性により生体分子を脱着制御する低分子ペプチドゲル化剤の開発
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川
33. 鈴木 洗希, 野尻 涼矢, 村岡 貴博
凝集抑制効果を有するチオール化合物のタンパク質フォールディング促進効果
第 72 回高分子討論会, 2023 年 09 月, 香川
34. Go Watanabe
A Computational Approach for Predicting Dynamics and Structure of Organic Crystals
The 6th International Conference on Molecular Simulation, 2023 年 10 月, 台湾
35. 矢口 敦也, 内田 紀之, 平松 弘嗣, 味岡 逸樹, 村岡 貴博
螺旋構造形成により生体接着制御する新規自己集合性ペプチドの開発と応用
第 13 回 CSJ 化学フェスタ 2023, 2023 年 10 月, 東京
36. 篠崎 雄大, 佐藤 俊輔, 關 拓和, 伊藤 良将, 竹谷 純一, 岡本 敏宏, 渡辺 豪
計算科学を用いた p 型有機半導体の集合体構造予測
第 13 回 CSJ 化学フェスタ, 2023 年 10 月, 東京
37. 馬場 ひとみ, 菱田 真史, 渡辺 豪
タンパク質の熱変性ダイナミクスに関する分子動力学的研究
第 13 回 CSJ 化学フェスタ, 2023 年 10 月, 東京
38. 村岡 貴博
損傷脳を再生する自己集合性ペプチド材料
第 96 回日本生化学会大会, 2023 年 10 月, 福岡
39. Itsuki Ajioka
Supramolecular Biomaterials for Injured Brain Regeneration
The 10th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress, 2023 年 11 月, 韓国
40. 喜多村 真衣, 村岡 貴博
疎水性空間を有する酸化的タンパク質フォールディング促進剤の開発
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
41. 吉澤 憲, 内田 紀之, 村岡 貴博
光応答性膜融合ベシクルの開発と細胞内物質輸送への応用
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
42. 近藤 詩織, 内田 紀之, 村岡 貴博
光選択的な液液相分離ドロプレットの安定性制御を可能にする自己集合性ペプチドファイバーの開発
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
43. 原 良佳, 矢口 敦也, 平松 弘嗣, 村岡 貴博
メチオニン含有ペプチドのゲルゾル転移と物質放出の速度制御
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
44. 山下 有希乃, 三浦 恵理香, 馬淵 拓哉, 村岡 貴博
液液相分離を用いた熱による酸化的タンパク質フォールディング促進
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
45. 矢口 敦也, 内田 紀之, 味岡 逸樹, 村岡 貴博
成長因子徐放性を有する超分子ゲル化ペプチドの開発と亜急性期脳梗塞治療応用
第 45 回バイオマテリアル学会大会, 2023 年 11 月, 神戸
46. 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を用いた有機結晶の構造安定性評価
第 37 回分子シミュレーション討論会, 2023 年 12 月, 福井
47. 石橋 広一朗, 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の生体分子吸着特性の解析
第 37 回分子シミュレーション討論会, 2023 年 12 月, 福井
48. 喜多村 真衣, 村岡 貴博
高濃度タンパク質の酸化的フォールディングを促進する両親媒性チオール化合物の開発
第 46 回日本分子生物学会年会, 2023 年 12 月, 神戸
49. 味岡 逸樹
Molecular design and development of supramolecular peptide hydrogels promoting angiogenesis after ischemic brain stroke
第 46 回日本分子生物学会年会, 2023 年 12 月, 神戸
50. Shiori Takayama, Saori Akimoto, Atsuya Yaguchi, Takahiro Muraoka, Chikako Hara-Miyauchi, Itsuki Ajioka
Viscoelastic Control of Tissue Culture Hydrogels and Their Application to Retinal Explant Culture
第 46 回日本分子生物学会年会, 2023 年 12 月, 神戸
51. 内田 紀之, 笠 勇之助, 松原 輝彦, 佐藤 智典, 安楽 泰孝, 村岡 貴博
ウイルスなどの巨大生体高分子の高効率封入・無毒化を可能にする膜変形リポソーム
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
52. 矢口 敦也, 味岡 逸樹, 村岡 貴博
生体組織の立体培養と回収を可能にする高強度と選択的分解性を兼ね備えた超分子ペプチドゲルの開発
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋

53. Keita Mori, Takahiro Muraoka
Oxidative Protein Folding Driven by Disulfide Compounds
Containing Cyclic Polyamine Ligands
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
54. 渡辺 豪
機能性ソフトマテリアルの構造・物性解明: 計算科学
とデータ科学によるアプローチ
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 千葉
55. 山下 有希乃, 三浦 恵理香, 馬淵 拓哉, 村岡 貴博
酸化還元活性を付与した液液相分離材料によるタンパ
ク質フォールディング促進
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
56. 樋口 元気, 内田 紀之, 村岡 貴博
液-液相分離を安定化するグラフトポリマーの開発と
生体分子の高感度検出
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
57. 原 良佳, 矢口 敦也, 平松 弘嗣, 村岡 貴博
メチオニン含有ペプチドでのゲルゾル転移と物質放出
速度制御
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
58. 喜多村 真衣, 村岡 貴博
ミセル形成チオール化合物による高濃度でのタンパク
質フォールディング促進
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
59. 鈴木 洗希, 野尻 涼矢, 齋尾 智英, 村岡 貴博
寛容なタンパク質認識特性を持つ酸化的フォールディ
ング促進剤の開発
日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 03 月, 船橋
60. 村岡 貴博
損傷脳機能回復を促す自己集合ペプチド分子技術
日本薬学会第 144 年会「中分子創薬に資する次世代分
子技術」, 2024 年 03 月, 横浜
61. 村岡 貴博
レドックス制御によるタンパク質フォールディング促
進
日本薬学会第 144 年会「構造薬科学 — “分子” 構造
を見る、知る、操る—」, 2024 年 03 月, 横浜
62. 森 圭太, 齋尾 智英, 村岡 貴博
環状ポリアミン誘導体の金属配位によるタンパク質凝
集抑制と酸化的フォールディング促進
日本薬学会第 144 年会, 2024 年 03 月, 横浜
63. 吉澤 憲, 内田 紀之, 村岡 貴博
可視光に応答して膜融合を発現するリボソームの開発
と細胞内物質輸送への応用
日本薬学会第 144 年会, 2024 年 03 月, 横浜
64. 原 良佳, 矢口 敦也, 平松 弘嗣, 村岡 貴博
超分子ペプチドゲルのゾル化転移速度を合理的に制御
する分子設計
日本薬学会第 144 年会, 2024 年 03 月, 横浜
65. 内田 紀之, 石坂 龍, 河北 杏樹, 奥村 正樹, 村岡 貴
博
リン脂質膜上におけるペプチド受容体の自己集合によ

り誘導される熱力学的安定なチューブ状リン脂質膜の
作成と応用

日本薬学会第 144 年会, 2024 年 03 月, 横浜

66. 矢口 敦也, 味岡 逸樹, 村岡 貴博
選択的分解能を持つ高強度超分子ペプチドゲルの開発
と三次元組織培養への応用
日本薬学会第 144 年会, 2024 年 03 月, 横浜

【特許】

国内特許出願 2 件