

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14577

研究課題名(和文) 脳内微小環境を人為制御する光応答性バイオマテリアルの開発

研究課題名(英文) Development of photo-responsive biomaterials mimicking brain microenvironment

研究代表者

味岡 逸樹(Ajioka, Itsuki)

東京医科歯科大学・統合研究機構(脳統合機能研究センター)・准教授

研究者番号：10348790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳の発生、病態、再生過程において、細胞外基質や増殖因子などが特定の場を集積して細胞機能を制御する微小環境が重要な役割を担っている。本研究では、その微小環境を模倣し、光で細胞機能を制御できる人工足場の開発を目的とし、試験管内では溶液状態で、生体内投与後にファイバー形状となり、細胞遊走の足場として機能するペプチド材料を作製した。さらに、光照射で機能制御できる機能ドメインを配向させたペプチド材料を作製した。

研究成果の概要(英文)：In the development, the pathology, and the regeneration of the brain, a microenvironment plays an important role in regulating cellular functions by assembling specific extracellular matrix and growth factors. In this study, we aimed to develop an artificial scaffold mimicking the microenvironment and regulating cellular functions by photo-stimulation. We developed peptide-based scaffolds that are soluble in tube but form fiber after in vivo injection. We also developed peptide-based scaffolds immobilized light-sensitive protein.

研究分野：生体材料

キーワード：脳発生 生体適合性材料 微小環境

1. 研究開始当初の背景

脳の発生、病態、再生過程において、細胞外基質や増殖因子などが特定の場を集積して機能する微小環境が重要な役割を担っている。例えば、脳血管網は、血管表面に局在する因子や分泌物を介して、遊走ニューロンの足場や神経幹細胞の維持機能を担っている。近年、人工的に微小環境を作製できるバイオマテリアル(生体適合性材料)が注目を浴びている。

申請者らはこれまでに、血管表面に存在する細胞外マトリックス (ECM) ラミニンを材料にスポンジ形状の人工足場を作製し、損傷脳への移植で、ニューロンを損傷領域に配置させる技術を開発してきた (Ajioka et al., *Biomaterials* 32, 5765-72, 2011; Ajioka et al., *Tissue Eng Part A* 21, 193-201, 2015)。しかしながら、この技術はランダム方向に成形したバイオマテリアルを移植するため、損傷領域へのニューロン配置は偶然的に生じるという欠点があった。そこで本研究では、バイオマテリアル移植後にニューロン遊走方向を人為的に操作し、特定の領域へとニューロンを配置させることを可能にする基盤要素技術の開発を目指した。

本研究の斬新性は光を用いて生体内の微小環境を操作する点である。近年、爆発的な発展を遂げているオプトジェネティクスは生体内で細胞内機能を人為操作できる点が強みである。一方、バイオマテリアルは細胞外微小環境を人為操作できる点が強みであり、生体外で光を用いて成形する技術も報告されているが (DeForest et al., *Nat Chem* 3, 925-931, 2011; DeForest., *Nat Mater* 14, 523-531, 2015)、今のところ生体内で微小環境を人為操作する技術は報告されていない。

本研究のチャレンジ性は、損傷した脳組織で微小環境を操作し、将来的には損傷脳の再生をめざす点である。

また、発展性として、本研究では損傷脳の再生過程におけるニューロンの配置に着目しているが、光応答性バイオマテリアルは様々な増殖因子の活性を模倣できる汎用性を持ち、軸索再生の制御も理論的には可能である。また、最近では、可視光と紫外光の両方を利用することで、合成と分解を制御できる材料も開発されており (DeForest et al., *Nat Chem*, 2011)、脳の再生時には足場として機能し、ネットワーク形成後には生体内で足場を解体できるようなバイオマテリアル開発も理論的には可能である。したがって、光応答性バイオマテリアルの開発は脳内微小環境の役割の解明とともに、現在実現困難と考えられている損傷脳再生の実現化への革新的技術となるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では、脳内に注入でき、注入後にファイバー形状になる生体材料、すなわちインジェクタブル材料を作製し、青色光で構造変化するタンパク質を配向結合させることを目的とした。

3. 研究の方法

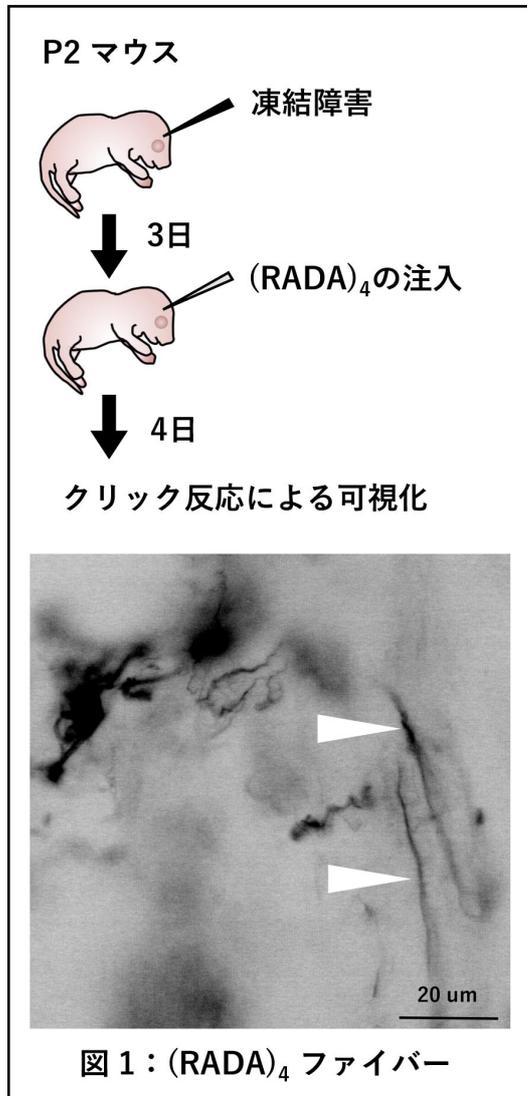
脳内に注入するインジェクタブル材料として、2種類の材料を検討した。1つ目は、20アミノ酸を連結したペプチドのN末にパルミトイル基を付加した両親媒性ペプチドを作製し、生体内でのファイバー化を検討した。この化合物は水に可溶だが、生理的濃度のカルシウムイオン存在下でファイバー形状になることが知られており、本研究では損傷脳内に投与した。2つ目は、アミノ酸 R-A-D-A (R: アルギニン、A: アラニン、D: アスパラギン酸) を4回繰り返したペプチド (RADA) 4 を作製し、生体内でのファイバー化を検討した。(RADA) 4 は pH2 塩酸水溶液で溶解させ、こちらも損傷脳内に投与した。

インジェクタブル材料を投与するマウス損傷脳モデルとして、小児外傷性脳損傷モデルである凍結傷害モデルを選択した。このモデルでは、液体窒素で冷やした金属の棒を頭蓋骨の表面に当てて脳傷害を惹起するモデルで、損傷レベルの再現性が高いモデルである。具体的には、出生2日目のマウスに凍結傷害を与え、傷害3日後にインジェクタブル材料を注入、さらに4日後にマウスを灌流固定した。インジェクタブル材料の形状を組織染色にて評価するために、両親媒性ペプチドや (RADA) 4 のN末端に6-Azido-hexanoic acidを修飾し、Alexa Fluor 647 Alkyneによるクリック反応でインジェクタブル材料を可視化した。

光で構造変化するタンパク質として、光屈性を担う青色光受容タンパク質フォトトロピンの光受容ドメイン (LOV1) を利用した。光屈性とは植物の茎が光の方向に曲がる性質であり、青色光吸収による LOV1 ドメインの構造変化に起因する。機能性タンパク質に LOV1 ドメインを融合させると、光照射でそのタンパク質が機能することが知られており、実際、オプトジェネティクスのツールとして汎用されている。本研究では、LOV1 ドメインそのものをインジェクタブル材料に結合する方法を確立するために、まず蛍光タンパク質 GFP を利用して条件検討を行い、その条件下において LOV1 ドメインを結合させた。

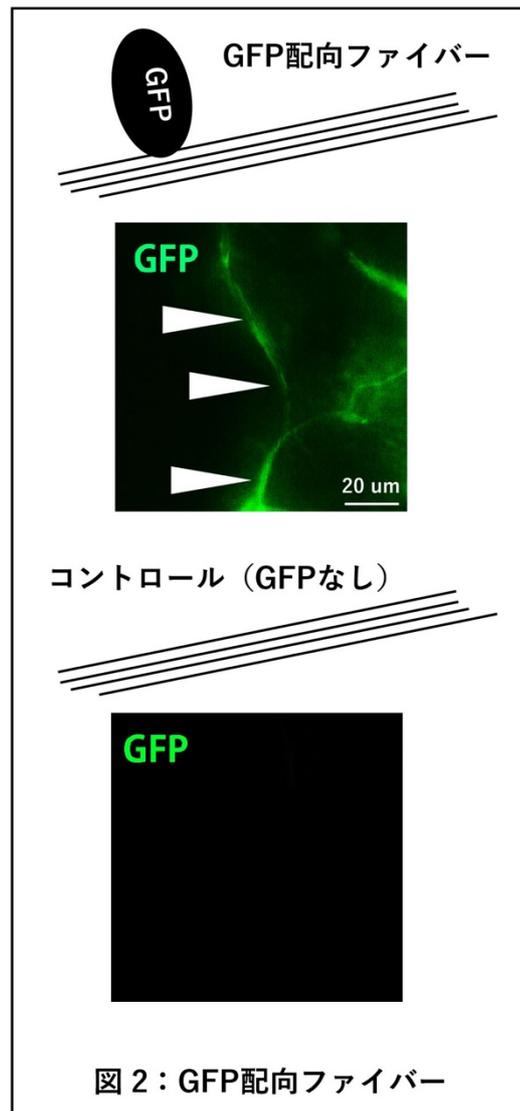
4. 研究成果

パルミトイル基を付加した両親媒性ペプチドおよび(RADA)4 をクリック反応による組織染色を行った結果、どちらも脳内で観察された。(RADA)4に関しては、注入の方法を工夫することによって、ファイバー状の構造が認められた(図1)。



知財保護の都合上、詳細な説明は省略するが、タンパク質をインジェクタブル材料に配向固定化する方法を検討し、最終的には、(RADA)4に効率よく配向固定化する方法を見出した。この方法ではパルミトイル基を付加した両親媒性ペプチドには配向固定化できなかったため、(RADA)4を本研究のインジェクタブル材料として利用することに決定した。図2に蛍光タンパク質GFPを配向固定化した(RADA)4の顕微鏡イメージを記した。

今後は、青色光を照射することで(RADA)4ファイバーの分子集合体形成、すなわち、ファイバーの方向性を制御できるかどうか検討する。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① Oshikawa M, Okada K, Kaneko N, Sawamoto K, Ajioka I, Affinity-Immobilization of VEGF on Laminin Porous Sponge Enhances Angiogenesis in the Ischemic Brain., *Adv Healthc Mater.* 査読有, 6, 2017, 1700183. doi: 10.1002/adhm.201700183.
- ② Fujioka T, Kaneko N, Ajioka I, Nakaguchi K, Omata T, Ohba H, Fässler R, García-Verdugo JM, Sekiguchi K, Matsukawa N, Sawamoto K. β 1 integrin signaling promotes neuronal migration along vascular scaffolds in the post-stroke brain. *EBioMedicine.* 査読有, 16, 2017, 195-203. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.01.005.
- ③ 味岡 逸樹、大脳皮質の再生—分子技術と神経発生生物学の融合によるアプローチ、*生体の科学*、査読無、68、2017、38-42.

- ④ 味岡 逸樹、中枢神経系の発生・再生研究においてバイオマテリアルの果たす役割、バイオマテリアル—生体材料—、査読無、35, 2017, 32-35.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 味岡 逸樹、人工足場創製による in vivo 脳組織工学、第 17 回日本再生医療学会総会、2018
- ② 味岡 逸樹、低酸素状態で構造変換するタンパク質を用いる脳再生デバイスの創製、日本化学会第 97 春季年会、2017
- ③ 味岡 逸樹、脳発生に倣う人工足場創製：成体損傷脳の再生を目指して、第 39 回日本分子生物学会年会、2016
- ④ 味岡 逸樹、脳卒中再生治療を目指したバイオアセンブラ、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、2016
- ⑤ 味岡 逸樹、脳卒中再生治療を目指した VEGF 配向スポンジ型マテリアル、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、2016

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/cbir/1/ajioka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

味岡 逸樹 (AJIOKA, Itsuki)

東京医科歯科大学・統合研究機構・脳統合機能研究センター・准教授

研究者番号：10348790