

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700468

研究課題名（和文） タンパク質製人工ニッチェの構築—パーキンソン病治療への応用—

研究課題名（英文） Design of artificial niche derived from functional proteins

研究代表者

中路 正 (Nakaji-Hirabayashi Tadashi)

富山大学・先端ライフサイエンス拠点・特命助教

研究者番号：10543217

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、パーキンソン病治療のための細胞移植に用いる、移植細胞の生存補助や分化誘導を担うタンパク質を組み込んだ、新規ハイドロゲル材料の創製に関して研究を進めてきた。特に、移植細胞の炎症反応からの保護、細胞接着足場の提供、移植細胞のドーパミン作動性細胞への分化誘導システムの構築、の3点を設計コンセプトに掲げて材料創製を試みた。主要な成果として、本研究で設計した材料を用いることにより、移植細胞の生存率を向上させることができ、また、分化誘導を厳密に制御できることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

I have been carried out the research for designing novel functional hydrogel incorporated with proteins for the protection and differentiation of transplanted cells. This hydrogel overcome the problems of “cell death with receiving damage from inflammatory response and an absence of adhesive scaffold” and “the deflection of ability for strictly regulating differentiation in the host tissue”. In this study, I designed a collagen-based hydrogel possessing an ability for protection of transplanted cells and a biodegradable microparticles for strictly regulating the differentiation into dopaminergic neuron.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学，医用生体工学・生体材料学

キーワード：人工臓器工学・再生医工学・キメラタンパク質・幹細胞

1. 研究開始当初の背景

再生医学・幹細胞生物学の目覚ましい進歩により、様々な損傷組織の再生が可能であると考えられる中、中枢神経においても再生の可能性が指摘されている。中枢神経再生が可能と考えられる主な理由として、成人脳におい

て、微量ながらも神経幹細胞の存在が明らかとなったことが挙げられる。それを契機に、十数年の間に、パーキンソン病やアルツハイマー病、脊髄損傷といった中枢神経疾患の治療に向けて研究が行われ、多くの生物学的知見が集積された。それら知見により導き出さ

れた考え方の一つが、高機能性バイオマテリアルの必要性である。

現在、中枢神経再生のための基となる細胞を補充するという考えのもと、細胞移植による治療が有望視されているが、多くの問題点が存在し、臨床応用にはほど遠いのが現状である。その中で最大の問題といわれるのが、移植細胞の生着率の低さである。これは、移植細胞が接着足場の欠如によってアポトーシス死すること、また移植初期に誘発される炎症反応によって死滅してしまうことが原因と考えられる。そこで低生着率を改善する方法として、バイオマテリアルの利用が有効と考えられ、移植細胞保護材料の開発が求められている。また、中枢神経再生のための細胞移植治療を実現させるためには、移植細胞の機能を厳密に制御できる微小環境の構築が必要であると考えられ、その要求を満たす材料の創製が求められている。このように、細胞移植医療の実現には、高機能バイオマテリアルの研究および開発が必要不可欠なものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、中枢神経疾患の一つであるパーキンソン病に対する細胞移植治療に貢献できるバイオマテリアルの創製を最終目標として、生体内において細胞を厳密に制御をしている微小環境を模倣した材料（人工ニッチ）の設計に取り組んだ。材料には、移植時に誘発される炎症反応からの保護、移植細胞の接着足場の提供、移植細胞の生存や分化誘導の制御、といった細胞移植で求められる機能を付与する。材質は、生分解性ハイドロゲルとする。この理由として、パーキンソン病治療では、インジェクト法により脳線条体へ細胞を移植するため、材料性質として、細胞と混合して移植できること、移植後にゲル化して細胞を包埋し炎症細胞から物理的に保護できること、が求められるためである。材料への機能付与は、細胞の機能制御を担うタンパク質を材料に組み込むことにより達成しようとする。材料へ機能タンパク質を組み込む方法として、遺伝子工学技術を利用して合成したキメラ蛋白質を用いる。遺伝子工学技術は、目的に応じて複数の機能を複合化したキメラ蛋白質を自在にデザインすることができるため、目的の基材に特異的に結合するドメインの導入が可能である。分子生物学分野で多用される遺伝子工学技術をバイオマテリアルに応用する試みは数少なく、先駆的な試みである。特に高機能な移植材料の創製にキメラ蛋白質を応用し、タンパク質製人工ニッチを構築する考え方は、本研究の大きな特色である。

3. 研究の方法

[1] 細胞制御キメラタンパク質創製

遺伝子工学技術を応用し、大腸菌発現系を用いることによって、細胞の接着や生存保護、分化を担うキメラタンパク質を合成した。これらタンパク質には、細胞と相互作用するドメインに加え、基材に安定に固定できるペプチド配列が連結されている。これによりタンパク質を基材へ担持することが可能となっている。

[2] 細胞制御因子の最適組み合わせのスクリーニング

細胞制御に最適な固定タンパク質とその組み合わせを探索するべく、タンパク質アレイ基板を作製し、そのアレイ上での細胞挙動を調査することにより、スクリーニングを行った。

[3] ドーパミン産生神経への高効率分化誘導基材の創製

タンパク質機能スクリーニングにより得た情報を元に、ドーパミン産生神経への高効率分化誘導を達成できる培養基材を創製した。タンパク質を安定担持できる基材を構築しその表面にタンパク質を固定した。そしてその上で神経幹細胞を分化誘導させ、基材の有効性を検証した。

[4] 移植細胞生存率向上のための神経幹細胞接着性キメラタンパク質担持コラーゲンハイドロゲルの設計

コラーゲンは、神経幹細胞・神経細胞の足場として不適合であるが、インジェクト法による細胞移植法には、マッチする材料である。そこで、コラーゲンに神経幹細胞・神経細胞接着性を付与するべく、ラミニンの細胞接着ドメイン由来の細胞接着性キメラタンパク質を創製した。そのタンパク質を担持させたコラーゲングル中での細胞生存に関して *in vitro* 評価を実施した上で、動物への移植により、移植用補助材料としての有効性を検証した。

[5] 移植細胞の生存率のさらなる向上を目指した抗炎症性サイトカインキメラタンパク質担持ハイドロゲルの設計

[4]のハイドロゲルをさらに高性能とし、生存率のさらなる向上を目指して、抗炎症性サイトカインキメラタンパク質を創製し、そのタンパク質をコラーゲングルへ担持させた。このキメラタンパク質は、炎症反応が惹起されたときにのみ、炎症細胞を迎撃するべくゲルから放出される「迎撃ミサイル型」の特徴を有している。このタンパク質を担持させたゲルと細胞の混合体に、炎症細胞である活性化ミクログリアを共存させ、細胞の生存

と炎症細胞の不活性化に関する評価を実施した。

[6] 移植細胞の分化を厳密に制御することのできるタンパク質精密徐放微粒子の創製

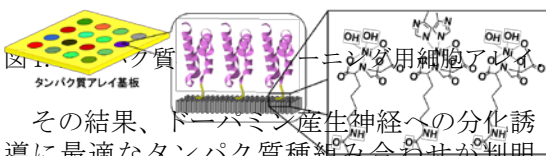
細胞の分化は、複数の制御因子が段階的に作用することによって効率良く行われることが知られている。そこで、ハイドロゲルに担持されたキメラタンパク質により初期分化を誘導し、そして、必要とする時機に別のキメラタンパク質を作用させ終分化へと誘導できるシステムとして、タンパク質精密徐放微粒子を新規開発した。この微粒子の特徴は、外層を数か月単位でしか分解しない高分子とし、内層を特定のタンパク質分解酵素によって分解する高分子としたことである。この内層にキメラタンパク質を担持させる仕組みにすることによって、内層分解によってのみタンパク質が放出される、つまり、タンパク質機能を内層高分子の分解で厳密に制御できるという仕組みになっている。この微粒子について、*in vitro*での評価を行い、その有効性について検証した。

4. 研究成果

[1] 神経分化に関連する栄養因子のキメラタンパク質、ラミニンの細胞接着ドメインだけで構成される細胞接着性キメラタンパク質、抗炎症性サイトカインのキメラタンパク質等、様々なキメラタンパク質を大腸菌発現系により合成した。このタンパク質合成では、複雑な構造を有する神経栄養因子などについて、分子シャペロン共発現系大腸菌を用いることで、フォールディングされ活性を有するタンパク質として得た。そのほかのタンパク質については、*in vitro*リフォールディング法（透析法）により活性再生を行った。

[2] 細胞の制御には、複数のタンパク質の作用が重要であることが分かっている。移植用補助ハイドロゲル内で効率良く移植細胞を分化させるためにタンパク質種とその組み合わせをスクリーニングした。図1に示すような基材を作製し、その上で細胞分化を評価した。

その結果、ドーパミン産生神経への分化誘導に最適なタンパク質種組み合わせが判明した（[3]にてその応用研究を実施）。また、脊髄神経、グルタミン作動性神経、末梢神経



のそれぞれに最適な組み合わせが本スクリーニングより明らかになった。

[3] タンパク質機能スクリーニングで得た知見を基に、ドーパミン産生神経への高効率分化誘導基材を創製した。本基材は、基材表面に、2種類の神経栄養因子キメラタンパク質および細胞接着性キメラタンパク質を担持させ、その上で、神経幹細胞を分化させるものである。

図2にその結果の一部を示す。従来から行われている、神経分化誘導因子を培地中に添加することによって行う誘導法と比較して、本設計基材（キメラタンパク質担持基板）上で誘導する方が、極めて効率良くドーパミン産生神経を得られることが分かった。本基材の開発に関して、特許出願を行った。

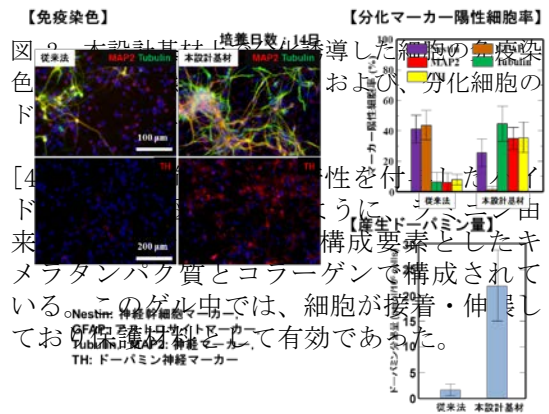


図2 本設計基材上で培養した細胞の免疫染色および分化細胞の割合。TH: ドーパミン神経マーカー、Nestin: 神経幹細胞マーカー。本設計基材は、従来の培地中での培養に比べて、ドーパミン産生神経の分化効率を大幅に向上させた。

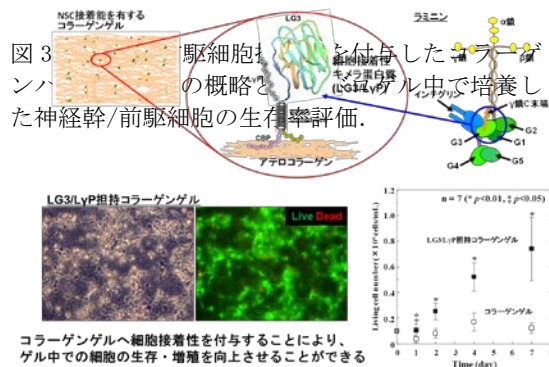


図3 LG3/LyP担持コラーゲンゲル中での神経幹/前駆細胞の生存・増殖率評価。コラーゲンゲルへ細胞接着性を付与することにより、ゲル中での細胞の生存・増殖を向上させることができる。

この結果を踏まえて、このハイドロゲルを用いて、ラットへの細胞移植実験を行ったところ、移植細胞の生存率が大幅に向上することが分かり、移植用補助材料としての有用性が立証された（図4）。

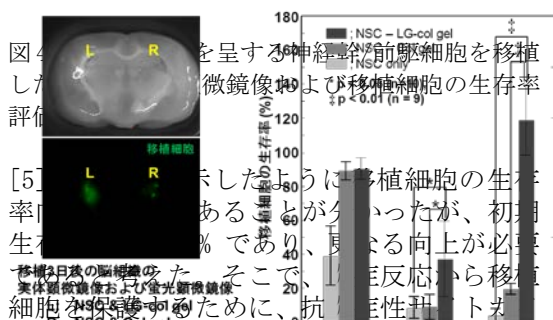


図4 神経幹/前駆細胞を移植したラットの脳を呈する蛍光顕微鏡像および移植細胞の生存率評価

[5] 移植細胞の生存率向上を図るために、炎症性サイトカインを抑制する抗炎症性サイトカイン担持ハイドロゲルと活性化ミクログリアを共存させた時、抗炎症性サイトカインがミクログリアが産生するプロテアーゼの作用によりゲルから放出され、ミクログリアを不活性化させることができた。この結果から、本システムが、生存率の更なる向上にかなり有効であると期待される。

神経幹/前駆細胞を含む抗炎症性サイトカイン担持ハイドロゲルと活性化ミクログリアを共存させた時、抗炎症性サイトカインがミクログリアが産生するプロテアーゼの作用によりゲルから放出され、ミクログリアを不活性化させることができた。この結果から、本システムが、生存率の更なる向上にかなり有効であると期待される。

[6] タンパク質作用を厳密に規定できる材料として、図5に示すようなタンパク質精密徐放微粒子を開発した。

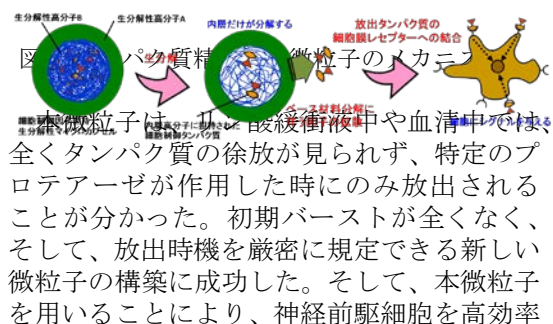


図5 タンパク質精密徐放微粒子の構造

タンパク質精密徐放微粒子は、生理的緩衝液中や血清中では全くタンパク質の徐放が見られず、特定のプロテアーゼが作用した時にのみ放出されることが分かった。初期バーストが全くなく、そして、放出時機を厳密に規定できる新しい微粒子の構築に成功した。そして、本微粒子を用いることにより、神経前駆細胞を高効率

で中脳成熟神経細胞に誘導できることを明らかにした。

成果の総括

本課題で研究を進めてきた材料を利用することにより、これまで克服が困難とされてきた、移植細胞の生存率向上に伴う、移植細胞源の節約や、移植細胞の厳密制御による無秩序分化の抑制と組織機能再生の促進が可能になるものと期待できる。

本成果を足掛かりに、より本格的な評価を行い、臨床応用・実用化に向けてさらに研究を進めていきたいと考える。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計3件）

- (1) Nakaji-Hirabayashi, T.; Kato, K.; Iwata, H. Improvement of neural stem cell survival in collagen hydrogels by incorporating laminin-derived cell adhesive polypeptides. *Bioconjugate Chem.* 2012, 23, 212-221.
- (2) Nakaji-Hirabayashi, T.; Kato, K.; Iwata, H. In vivo study on the survival of neural stem cells transplanted into the rat brain with a collagen hydrogel that incorporates laminin-derived polypeptides. *Bioconjugate Chem.* 2013, in press.
- (3) Gujral, C.; Minagawa, Y.; Fujimoto, K.; Kitano, H.; Nakaji-Hirabayashi, T. Biodegradable microparticles for strictly regulating the release of neurotrophic factors. *J. Control. Release*, 2013, 168, 307-316.

〔学会発表〕（計17件）

- (1) ○中路 正、加藤功一、岩田博夫、細胞接着性キメラ蛋白質担持コラーゲンゲルによる移植神経幹細胞の生存率向上、『第39回 医用高分子研究会シンポジウム』、No. 2、東京大学、2010年7月26-27日（PostDoc奨励発表・最優秀賞受賞）
- (2) ○中路 正、加藤功一、岩田博夫、神経栄養因子固定培養基材を用いたドーパミン産生細胞への分化誘導、『第32回 日本バイオマテリアル学会大会』、02-13、グランドプリンスホテル広島、2010年11月29-30日
- (3) ○中路 正、加藤功一、岩田博夫 神経幹前駆細胞からドーパミン産生細胞を効率よく誘導するための基材設計、『第60回 高分子学会年次大会』、1Pd138、

- 大阪国際会議場、2011年5月25-27日
- (4) ○皆川 雄太、Chirag Gujral、北野 博巳、中路 正 幹細胞のin situ分化制御のための神経栄養因子キメラ蛋白質内包高分子微粒子、『第60回 高分子北陸支部研究発表会』、C-23、金沢大学、2011年11月19-20日
- (5) ○中路 正、源明 誠、北野 博巳 炎症反応を局所的に鎮静化させる作用時機規定型Interleukin-10の設計、『第33回 日本バイオマテリアル学会大会』、023-1、京都テルサ、2011年11月21-22日
- (6) Nakaji-Hirabayashi T. Design of Hydrogel for Transplantation of Neural Stem/progenitor Cells. The 2nd International Symposium on Cancer and Cancer Stem Cells Research in Toyama. University of Toyama, Toyama, Japan. No. 2. 28th, Feb, 2012
- (7) ○中路 正 幹細胞の機能制御を目的としたキメラタンパク質製生理活性材料の設計、『医工学フォーラム—2011年度特別学術講演会—』、長石賞受賞講演、京都テクノパーク、2012年2月22日(京都大学再生医科学研究所研究奨励賞(長石賞)受賞)
- (8) ○中路 正、源明 誠、北野博巳 神経幹/前駆細胞講演題目脳の移植に適応するハイドロゲル材料の設計、『第61回 高分子学会年次大会』、1Pf124、パシフィコ横浜、2012年5月29-31日
- (9) ○グジュラル・チラグ、皆川雄太、北野博巳、中路 正 移植神経幹/前講演題目駆細胞の神経分化制御のための高分子微粒子、『第61回 高分子学会年次大会』、1Pf128、パシフィコ横浜、2012年5月29-31日
- (10) ○中路 正、グジュラル・チラグ、皆川雄太、藤本くる美、源明 誠、北野博巳 移植幹細胞の機能制御のための高機能ハイドロゲルの設計、『第41回 医用高分子シンポジウム』、No. 12、東京大学、2012年6月25-26日
- (11) Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Chirag Gujral, Yuuta Minagawa, Hiromi Kitano. Designing a novel system for strictly regulating the differentiation of transplanted neural stem/progenitor cells in the brain tissue. The 3rd TERMIS World Congress, Vienna, Austria (Sep 4 - 8, 2012)
- (12) Chirag Gujral, Yuuta Minagawa, Kurumi Fujimoto, Hiromi Kitano, Tadashi Nakaji-Hirabayashi. Biodegradable microparticles for regulating differentiation of neural

stem/progenitor cells for treatment of Parkinson's disease. Second Symposium on Innovative Polymers for Controlled Delivery, Suzhou, China (Sep. 11 - 14, 2012)

- (13) ○中路 正、グジュラル・チラグ、源明 誠、北野博巳 幹細胞の機能制御を目指した三次元マトリックスの設計、『第61回 高分子討論会』、2X12、名古屋工業大学、2012年9月19-21日
- (14) ○古川彩希、北野博巳、中路 正、キメラタンパク質固定基材上におけるヒト人工多能性幹細胞の未分化維持培養システムの構築、『第61回 高分子学会北陸支部研究発表会』、C20、福井大学、2012年11月17-18日
- (15) ○藤本くる美、北野博巳、中路 正、神経分化誘導マトリックス創製のための基材担持タンパク質のスクリーニング、『第61回 高分子学会北陸支部研究発表会』、C21、福井大学、2012年11月17-18日
- (16) ○藤本くる美、北野博巳、中路 正、高機能三次元マトリックス創製のための基材担持タンパク質スクリーニング、『第1回日本バイオマテリアル学会北陸ブロック若手研究発表会』、004、金沢迎賓館、2012年12月25日
- (17) ○古川彩希、北野博巳、中路 正、細胞制御キメラタンパク質を利用したヒト人工多能性幹細胞のフィーダーフリー培養系の構築、『第1回日本バイオマテリアル学会北陸ブロック若手研究発表会』、005、金沢迎賓館、2012年12月25日

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称：ドーパミン産生神経の分化誘導用の細胞培養基材

発明者：中路 正，加藤功一，岩田博夫

権利者：京都大学、日本製粉㈱

種類：特許

番号：特開2012-246249

出願年月日：2011年5月23日

国内外の別：国内

名称：生理活性物質徐放制御組成物

発明者：中路 正，北野博巳，Chirag Gujral

権利者：富山大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/79062

出願年月日：2012年11月9日

国内外の別：国際

*国内特許出願後PCT出願(見なし取下げ)

優先元：特願2011-251957

優先日：2011年11月17日

〔その他〕

ホームページ：

<http://www3.u-toyama.ac.jp/nakajilb/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中路 正 (Nakaji-Hirabayashi Tadashi)
富山大学・先端ライフサイエンス拠点・特
命助教
研究者番号：10543217