

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750156

研究課題名(和文)細胞微小環境の協奏的制御による神経組織の再生

研究課題名(英文)Neuroregeneration by concerted regulation of cellular microenvironments

研究代表者

橋本 良秀 (Hashimoto, Yoshihide)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：40638384

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)：本研究は、損傷した神経組織の再生するための生体内微小環境を模倣したナノマトリクスを開発することを目的としている。脳の細胞外マトリクスの構成成分の一つであるコンドロイチン硫酸にコレステリル基とメタクリロイル基を導入する手法を確立し、新規ナノゲルの開発に成功した。得られたナノゲルをビルディングブロックとしてタンパク質とエキソソームを複合化したナノマトリクスを開発した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop the nano-matrix that mimicked cellular microenvironments for regeneration of injured neural tissues. We established the synthetic method of methacryloyl group- and cholesteryl group- bearing chondroitin sulfate (CH-GAG-MA), and successfully developed novel nanogels. We also developed the nano-matrix complexed with proteins and exosomes using CH-GAG-MA nanogels as building blocks.

研究分野：再生医工学

キーワード：ナノゲル 細胞微小環境 神経再生 グリコサミノグリカン 組織工学 エキソソーム

1. 研究開始当初の背景

近年、神経変性疾患や脊髄損傷の治療を目的として、神経幹細胞移植による中枢神経系の再生が試みられている。しかしながら、神は、脳脊髄液の循環による移植細胞の分散やニューロン分化率の低さから、神経幹細胞のみを損傷部位に移植するだけでは効果的な神経組織の再生は望めない。生体内において細胞の機能は、細胞間の相互作用や細胞周辺に存在する細胞外マトリクス、さらには細胞増殖因子やサイトカインによって厳密に制御されているためである。したがって、細胞がその機能を正しく発現するためには、それに適した環境を供給する必要がある。これまでに、神経幹細胞を合成高分子やペプチドから構成されるハイドロゲルとともに移植することで、移植細胞の生着・分化率を向上させる試みがなされている。部分的な神経組織の再生は確認されているものの、正常ニューロンと移植細胞との神経ネットワークの再構築など機能の再生は達成されていない。そこで申請者は、これらの問題が細胞間の情報伝達が正常に機能していないことに起因すると考え、細胞間の仲介者と考えられているエキソソームに着目した。エキソソームは、脂質二重膜からなる直径 30-100nm の膜小胞で、分泌細胞由来の膜タンパク質と細胞質成分で構成されており、その機能は、分泌する細胞の種類により異なると考えられている。最近、アルツハイマー病やプリオン病を引き起こすタンパク質が、変性した神経細胞由来のエキソソームによって細胞外へ放出されることが明らかとなり、これらの疾患の病態発生に深く関与する可能性が示されている。その一方、正常細胞から放出されるエキソソームの生理的機能や意義も明らかにされつつある。特に、興味深いことに、神経細胞由来のエキソソームに存在する microRNA が脳卒中後の神経機能回復に関与することが示唆されている。申請者はこれまでに、親水性高分子である多糖に疎水基を部分的に導入した疎水化多糖が自己組織化することにより形成されるナノゲルをビルディングブロックとして集積したナノゲル架橋ゲル(ナノマトリクス)を開発し、タンパク質を封入したナノマトリクスが組織再生に有効であることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、種々のタンパク質を封入したナノマトリクスと神経幹細胞由来のエキソソームを複合化することにより、神経組織の再生に必要な生体内の微小環境を再構築することを目的とする。このナノマトリクスは、分解に伴いタンパク質を内包したナノゲルを放出し、その後ナノゲルからタンパク質を放出する 2 段階の放出機構を特徴とし、長期の細胞機能制御を可能にする。ナノマトリクスの分解速度は、自在に調節可能である。一方、エキソソームは、膜タンパク質を介して

ナノゲルと相互作用しながら放出され、内包する mRNA や microRNA によって細胞の機能制御に寄与する。このように、ナノゲル、タンパク質、エキソソームが協奏的に作用することで、厳密な細胞の機能制御や効果的な組織再生が達成できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 重合性基を有する疎水化グリコサミノグリカン(CH-GAG)の合成

疎水化グリコサミノグリカンの合成
グリコサミノグリカンとして、脳の細胞外マトリクスの構成成分の一つであるコンドロイチン硫酸を用いた。コンドロイチン硫酸のテトラブチルアンモニウム塩(CSC-TBA)をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、縮合剤存在下にてコレステリル-6-アミノヘキシルカルバメートと反応させた。反応終了後、再沈・透析により精製した。疎水基の導入量を ¹H-NMR により算出した。また、疎水化コンドロイチン硫酸を生理食塩水に溶解させた後、疎水性相互作用による会合体形成を動的光散乱(DLS)測定により評価した。

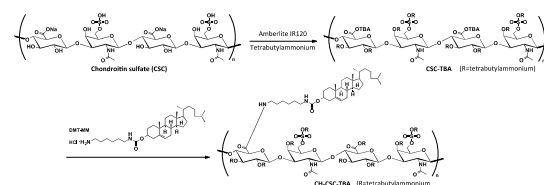


図1 疎水化グリコサミノグリカンの合成

メタクリロイル基を導入した疎水化グリコサミノグリカン(CH-GAG-MA)の合成

合成した疎水化グリコサミノグリカンを溶解し、縮合剤存在下にて 2-メタクリロイルオキシエチルアミンと反応させた。反応終了後、再沈により精製し、その後、テトラブチルアンモニウムを除去した。メタクリロイル基の導入量を ¹H-NMR により算出した。また、同様に DLS による粒子径の測定を行った。

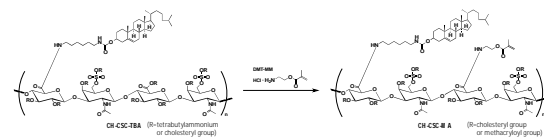


図2 CH-CSC-MA の合成

(2) CH-GAG-MA を用いたナノマトリクスの作製とエキソソームとの複合化

CH-GAG-MA を PBS(pH7.4)に溶解した。導入されたメタクリロイル基に対して 1:1 (モル比)となるように末端チオール化ポリエチレングリコール(PEGSH)を加えた。湿潤下、37℃にて所定時間反応させることでナノゲルを集積したナノマトリクスの作製を試みた。また、得られたナノマトリクスとタンパク質およびエキソソームとの相互作用について検討した。

4. 研究成果

(1) 重合性基を有する疎水化グリコサミノグリカンの合成

疎水化グリコサミノグリカンの合成

末端にアミノ基を有するコレステロール誘導体を合成し、コンドロイチン硫酸に縮合反応により導入を行った。¹H-NMR 測定より 100 単糖当たり約 8 個のコレステリル基が導入されたことが確認された (図 3a)。また、DLS 測定から粒径約 150nm、多分散指数 (PDI)0.06 の比較的単分散な微粒子を形成していることが明らかとなった (図 3b)。

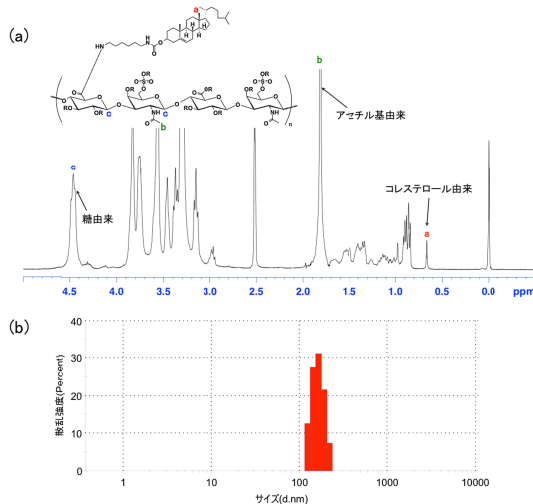


図 3 CH-GAG の NMR スペクトルと CH-GAG 溶液の DLS 測定結果

メタクリロイル基を導入した疎水化グリコサミノグリカン(CH-GAG-MA)の合成

CH-GAG ナノゲルを集積するために、重合性基の導入を試みた。まず、末端にイソシアネート基を有するアクリレートを用いて合成を試みたが、反応中にゲル化することが分かった。そこで、より反応性の低いアミノエチルメタクリレートに変更し、重合性基の導入を行った。¹H-NMR 測定より 100 単糖当たり約 19 個のメタクリロイル基が導入されたことが確認された (図 4a)。

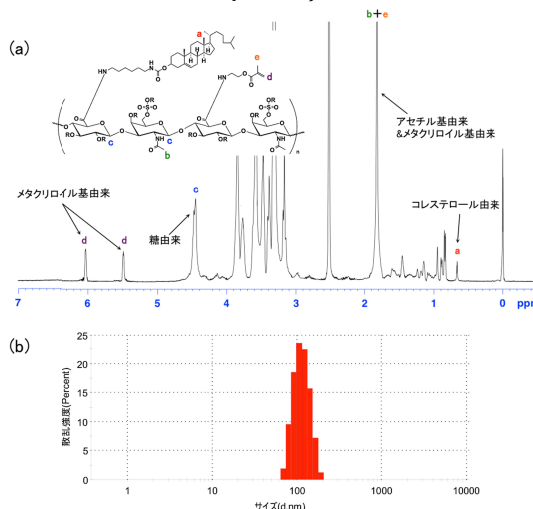


図 4 CH-GAG-MA の NMR スペクトルと CH-GAG-MA 溶液の DLS 測定結果

また、DLS 測定から粒径約 100nm、多分散指数 0.03 の比較的単分散な微粒子を形成していることが明らかとなった (図 4b)。メタクリロイル基を導入することにより粒径の減少が観察された。また、得られた微粒子は比較的安定であることも明らかとなった。

(3) CH-GAG-MA を用いたナノマトリクス の作製とエキソソームとの複合化

CH-GAG-MA を 10、20、30、40、50、60mg/ml となるように PBS に溶解した。種々の溶液に対して PEGSH をアクリル基：チオール基 = 1:1(molar ratio)となるように混合した。ポルテクスで混合後、Tilt 法によりゲル化の確認を行った。CH-GAG-MA 濃度が低い場合は、ゾル状になり濃度が高くなるにつれてゲルが形成された。これにより、インジェクタブル可能なソフトゲルからバルク状のリジッドなゲルまで作製できることが明らかとなった。

そこで、リジッドなゲルを用いてエキソソームとの複合化について検討した。エキソソームを可視化するために 5- or 6-(N-Succinimidylloxycarbonyl)fluorescein 3',6'-diacetate (CFSE)で標識を行った。ハイドロゲルをエキソソーム溶液に浸漬し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した結果、ほとんど相互作用していないことが分かった。エキソソーム表面は、マイナス電荷に富んでいる。また、CH-GAG-MA ナノゲルもカルボキシル基を有しているためマイナスにチャージしている。そのため、静電反発によって複合化されなかったと考えられる。これに関しては、CH-GAG-MA ナノゲルとエキソソームを混合し、その後ゲル化させることにより解決することが可能であった。現在、ラット神経幹細胞との相互作用について解析を進めているところである。

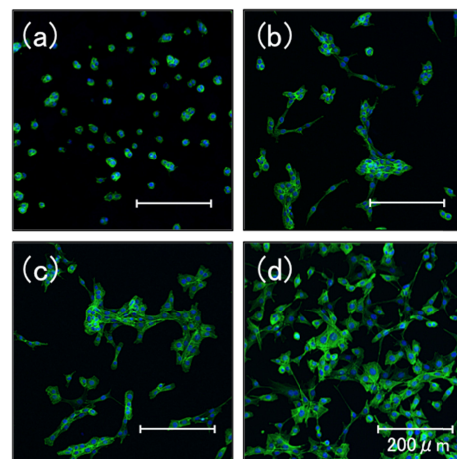


図 5 架橋度の異なるナノゲル表面での細胞挙動。(a) 100:0, (b) 100:1, (c) 100:2, (d) 100:10.

CH-GAG ナノゲルは酸性ムコ多糖から構成されている。そこで、コントロールとなる中性多糖ナノゲルを用いた人工細胞外マト

リクスの作製も同時に進めてきた。中性多糖ナノゲルを培養シャーレにナノゲル架橋ゲルフィルムを作製し、間葉系幹細胞との相互作用について検討した。ナノゲル表面では、細胞接着が抑制される傾向が観察された。そこで、ナノゲルに接着タンパク質であるビトロネクチンを内包させ、同様の実験を行った。その結果、ナノゲル架橋ゲルフィルムの堅さに応じて、細胞形態や増殖が変化することが明らかとなった(図5)。

以上のように、ナノゲルを構成する多糖の種類や疎水化度を調整することで細胞機能を制御できる可能性が示唆された。

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5件)

- (1) Y. Hashimoto, S. Mukai, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi. Advanced artificial extracellular matrices using amphiphilic nanogel-cross-linked thin films to anchor adhesion proteins and cytokines. *ACS Biomater Sci & Eng*, 2, 375-384, (2016). 査読有, DOI:10.1021/acsbiomaterials.5b00485
- (2) H. Maeda, H. Kobayashi, T. Miyahara, Y. Hashimoto, K. Akiyoshi, S. Kasugai. Effects of a polysaccharide nanogel-crosslinked membrane on wound healing. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, Published online 2015 in Wiley Online Library, 査読有, DOI: 10.1002/jbm.b.33571.
- (3) Y. Hashimoto, S. Mukai, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi. Nanogel tectonic porous gel loading biologics, nanocarriers, and cells for advanced scaffold. *Biomaterials*, 37, 107-115, (2015). 査読有, Doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.045.
- (4) H. Fujii, M. Shin-Ya, S. Takeda, Y. Hashimoto, S. Mukai, S. Sawada, T. Adachi, K. Akiyoshi, T. Miki, O. Mazda. Cycloamylose-nanogel drug delivery system-mediated intratumor silencing of the vascular endothelial growth factor regulates neovascularization in tumor microenvironment. *Cancer Sci*, 105, 1616-1625, (2014). 査読有 DOI: 10.1111/cas.12547.
- (5) M. Yokota, Y. Kobayashi, J. Morita, H. Suzuki, Y. Hashimoto, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Moriyama. Therapeutic Effect of Nanogel-Based Delivery of Soluble

FGFR2 with S252W Mutation on Craniosynostosis. *PLoS One*, 9,e101693-e101704, (2014), 査読有, Doi:10.1371/journal.pone.0101693.

〔学会発表〕(計6件)

- (1) 藤原理絵, 橋本良秀, 丸川恵理子, 澤田晋一, 向井貞篤, 佐々木善浩, 秋吉一成. 有機-無機ハイブリッドポラス材料の設計と再生医療応用, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ(京都府, 京都市), 2015年11月.
- (2) 藤原理絵, 橋本良秀, 丸川恵理子, 澤田晋一, 向井貞篤, 佐々木善浩, 秋吉一成. 有機-無機ハイブリッドポラス材料の設計と医療応用, 第64回高分子討論会, 東北大学川内キャンパス(宮城県, 仙台市), 2015年9月.
- (3) 向井貞篤, 橋本良秀, 田原義朗, 澤田晋一, 秋吉一成. ナノゲルテクトニクス材料: ナノゲル架橋ハイブリッドフィルムの創製と機能評価, 第64回高分子学会年次大会, 札幌コンベンションセンター(北海道, 札幌市), 2015年5月.
- (4) 沖田圭司, 竹田茂生, 橋本良秀, 向井貞篤, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成. 多糖ナノボールの集積制御に基づく新規ゲル材料の設計とバイオマテリアル応用, 第64回高分子学会年次大会, 札幌コンベンションセンター(北海道, 札幌市), 2015年5月.
- (5) 橋本良秀, 向井貞篤, 澤田晋一, 秋吉一成. 多孔質構造を有するナノゲル架橋ハイブリッドゲルの開発と機能評価, 第63回高分子討論会, 長崎大学文教キャンパス(長崎県, 長崎市), 2014年9月.
- (6) Y. Hashimoto, S. Mukai, S. Sawada, K. Akiyoshi. Fabrication of nanogel-crosslinked porous gels for tissue engineering applications. The 41st annual meeting & exposition of the controlled release society, Chicago, USA, 2014年7月.

〔その他〕

ホームページ等

- (1) <http://www.akiyoshi-lab.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 良秀 (HASHIMOTO YOSHIHIDE)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教
研究者番号: 40638384