様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２２年５月３１日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：19300171
研究課題名（和文）タンパク質工学による神経幹細胞移植用スキャフォールドの設計
研究課題名（英文）Designing tissue engineering scaffolds for neural stem cell transplantation through protein engineering

研究代表者
加藤　功一（KATO KOICHI）
京都大学・再生医科学研究所・准教授
研究者番号：50283875

研究成果の概要（和文）：中枢神経組織内に移植された神経幹／前駆細胞の生着を助けるためのタンパク質性キャリアー材料の設計に取り組んだ。その結果，コラーゲンやヒアルロン酸のような天然高分子がベース材料として有用であり，また，増殖因子，神経栄養因子，インテグリン結合ドメインなどを，タンパク質工学による分子設計手法を駆使してベース材料内に担持させる方法が，細胞の生存率向上にきわめて有効であることがわかった。このような複合材料の設計法は，中枢神経疾患の再生医療の進歩に大きく寄与するものと考える。

研究成果の概要（英文）: This project was aimed at developing protein-based biomaterials that serve to improve the survival and engraftment of neural stem/progenitor cells transplanted into central nervous tissues for therapeutic purposes. It was shown that hydrogels made of naturally-occurring polymers such as collagen and hyaluronic acid could be suitably used as base materials. In addition, protein engineering strategies were employed to incorporate growth factors, neurotrophic factors, and/or integrin binding polypeptide domains into the base materials. We demonstrated that such approaches were quite effective for improving survival of cells embedded in the hydrogels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総　計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：キメラタンパク質，再生医療，中枢神経，細胞増殖因子，幹細胞移植，バイオマテリアル，ハイドロゲル，自己組織化

１．研究開始当初の背景

研究開始当初，様々な中枢神経疾患に対する再生医療の試みが各国で盛んに行われ，社会からの大きな期待が寄せられていた。

治療対象のひとつに脊髄損傷があった。脊髄損傷は身体の重篤な麻痺を伴う疾患である。国内で 10 万人以上もの患者が脊髄損傷に苦しみ，年間 5,000 人の人が新たに罹患する。それにもかかわらず，有効な治療法のないのが現状であった。研究開始までに，中枢神経の発生および神経幹細胞に関する生物学が急速に進歩し，神経幹細胞移植による損傷脊髄の再生治療に大きな期待が寄せられるようになっていた。我が国を含む複数の国々において，神経幹細胞の移植研究が盛んに進められていた。たとえば，ヒト胎児由来神経幹細胞，自家嗅粘膜組織，骨髄細胞を細胞ソースとした細胞移植療法が本邦において盛んに研究されていた。また，米国では，ヒト ES 細胞から誘導されたオリゴデンドロサイトの移植による損傷脊髄の再生治療が臨床研究に入ろうとしていた。その他，韓国のグループからも，臍帯血由来間葉系幹細胞を利用した治療実験が報告されていた。損傷脊髄では，脊椎の変形によって生じる神経軸策の断裂，および，それに伴う二次的な組織変性が認められる。上記の細胞移植療法では，神経幹細胞から分化する介在ニューロンによる残存ニューロンのバイパス，あるいは，オリゴデンドロサイトによる損傷軸策のミエリン化促進を目的とする。

もう一つの重要な治療対象として神経変性疾患に分類されるパーキンソン病があげられる。中脳黒質内の神経細胞の障害によりドーパミンの産生が低下し，それに伴って運動機能の障害をきたす疾患である。日本全体で 10 万人以上の患者さんがいると推定され，難病のひとつに指定されている。研究開始当時，この疾患を対象に，胚性幹細胞から分化誘導された神経前期細胞，あるいは，中絶胎児脳から得られた神経幹細胞等を，パーキンソン病に罹患した脳の線条体に移植する試みが行われていた。その後，iPS 細胞の出現とともに治療のための基礎研究が過熱している。

ところが，上記の試みには未解決な問題も多い。まず，これまでの幹細胞移植では，培地等に分散させた細胞を損傷部位に直接注入するのが一般的である。しかしこの方法では，脳脊髄液の循環によって移植部位から細胞が分散しやすい。また，移植に伴う炎症生細胞の浸潤によって移植細胞がダメージを受ける。これらは，移植細胞の生着率の低下を招き，移植効果が著しく損なわれる結果となる。さらに，従来の移植法だけでは，患部における移植細胞の分化，増殖，移動，そしてホストニューロンとの機能的シナプス形成を人為的に制御するのは困難であった。神経成長因子や分化因子などの血管内，脳内投与も検討されているが，これらの因子の投与部位からの消失も，細胞の場合と同様に大きな課題であった。

２．研究の目的

本研究では，移植部位における神経幹／前駆細胞の生着率を向上させるための細胞キャリアー材料（スキャフォールド）の設計を目的とした。キャリアー材料とともに細胞を移植することによって，細胞を移植部位に留め，炎症生細胞の浸潤を防ぐと同時に，移植細胞の増殖・分化・移動・機能発現の制御を目的とする。本研究では，このような機能を備えたキャリアー材料を合理的にデザインするため，遺伝子組み換えによる人工タンパク質の設計手法を採用した。タンパク質性のスキャフォールドは，生体内でプロテアーゼによる分解を受けるため，目的を達した後には残存せず，神経ネットワークの再構築に悪影響を与えることはないと考えた。

本研究で設計を試みたタンパク質性キャリアー材料は次の 2 つの要求事項を満足するものである。

（１）溶液状態にあるタンパク質を移植細胞とともに患部に注入すると速やかにゲルを形成し，細胞の分散を防ぐことのできるような物理化学的性質をもつハイドロゲル状材料。

（２）移植細胞の増殖，分化，移動，シナプス形成などを高度に制御できるポリペプチド鎖（神経成長因子，細胞接着分子，軸索伸長促進因子などの全長あるいはそれらの機能部位）を移植細胞に提示することができる材料。

３．研究の方法

（１）構造形成ドメインの選択

細胞とともに患部に注入して，ゲルを形成させ，細胞の逸脱を防ぐための骨格成分について検討した。天然のタンパク質の中から構造形成ドメインの候補となるポリペプチドを選定し，それらを組込んだキメラタンパク質を大腸菌発現系を用いて合成した。とくに，中間径フィラメントタンパク質であるケラチンに焦点を当て，そのキメラタンパク質の構造形成能について基礎データを取得した。さらに，コラーゲンやヒアルロン酸などの天然高分子の有用性についても比較検討した。

（２）機能ドメインに関するスクリーニング

移植された細胞に積極的に働きかけるための機能ドメインに関して検討した。細胞増殖因子（EGF, bFGF, IGF-1），神経成長因子（BDNF, CNTF, GDNF），細胞接着分子（NCAM），細胞外マトリックス（laminin）の全長あるいは機能部位を含むペプチドを，上記の構造形成ドメインに融合させた組換えタンパク質あるいは骨格成分と特異的相互作用が可能なドメインをもつ組換えタンパク質を合成した。それらの機能評価を培養神経幹細胞

を用いて行った。

（３）神経系細胞の培養試験

上記（１）および（２）の検討の結果を踏まえ，ケラチン由来構造形成ドメインとラミニン由来細胞接着性ドメインを融合したキメラタンパク質，また，天然高分子（コラーゲン，ヒアルロン酸）とキメラタンパク質（EGF 融合体，BDNF 融合体，ラミニンペプチド融合体）の複合体を合成した。神経幹細胞を複合体内に分散させたときの細胞の生存率について評価した。

４．研究成果

（１）分解性ゲル形成材料

分子間会合によってコイルドーコイル構造を形成する中間径繊維由来のドメイン，あるいは，自己組織化によって微細繊維からなるゲルを形成するコラーゲン，架橋によってゲルを形成するヒアルロン酸について検討し，それらの構造形成要素としての有効性について基礎的知見を得た。

ケラチンに代表される中間径フィラメントタンパク質は，隣り合う分子間でコイルドコイル構造にもとづき，微細な繊維を形成する。ケラチンには，アミノ酸配列の異なる多くのアイソタイプが存在するが，本研究では，ヒト毛髪からケラチン-5 とケラチン-14 を抽出した。これらの溶液を混合することでヘテロ二量体を形成させ，その結果，試験管内でハイドロゲルを生成させることに成功した。

このハイドロゲルは細胞表面の接着分子と結合する性質をもたないため，細胞非接着性である。そこで，ケラチンの再生過程に，ケラチン分子とインテグリン結合ドメインを連結したキメラタンパク質を介在させ，ハイドロゲル内にそのドメインを組み込んだ。ここで連結されたドメインは，ECM の一成分であるラミニンに由来し，ラミニンα３鎖 G3 ドメインと呼ばれる配列である。このドメインは，インテグリンと結合することが報告されている。このようにして作製されたハイドロゲルは，神経幹細胞の接着および増殖に適した環境を与えることが示された。

以上のように，ケラチンを用いた材料設計は可能であることが示された。しかしながら，細胞との混合の過程で，強力な変性剤と細胞との接触を避けることが難しく，移植材料として決して満足できるものではなかった。

そこで，次に，コラーゲンやヒアルロン酸のように，すでに医療用材料として用いられており，しかも，ゲル成分として利用しやすい素材について検討した。ヒアルロン酸を用いる場合には，ゲルの力学的性質を最適化するため架橋反応が必要であったが，これには，ヒアルロン酸誘導体と２官能性αヘリックス型オリゴペプチドとの反応が有効であることを示した。

（２）機能ドメインスクリーニング

①サイトカイン

各種のサイトカイン（細胞増殖因子および神経栄養因子）が神経幹細胞の増殖および分化に及ぼす影響について調べた。多種類のサイトカインおよびそれらの組み合わせについて効率よく調べるため，サイトカインアレイを用いてパラレル分析を行った。

まず，遺伝子工学的手法により，上皮増殖因子（EGF），塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF），インスリン様細胞増殖因子 1（IGF-1），脳由来神経栄養因子（BDNF），毛様体由来神経栄養因子（CNTF）のそれぞれ C 末端に 6 残基のヒスチジン（His）を融合したキメラ蛋白質を合成した。キメラ蛋白質の His-tag と，基板表面にアレイ状に導入した Ni^{2+}イオンとの間でキレート結合を形成させることでキメラ蛋白質を配列固定した。このアレイ上で，ラット胎児（E16）の線条体から得た神経幹細胞を 3〜5 日間培養した。細胞の増殖性は 5-bromo-2'-deoxyuridine の取り込み能をもとに評価した。細胞の分化状態は，nestin（神経幹細胞マーカー），β-tubulin III（神経細胞マーカー），glial fibrilar acidic protein（アストロサイトマーカー）を免疫染色することによって調べた。

各種のサイトカインを固定したスポット上に細胞が接着し，神経突起が伸展した。EGF 固定スポットあるいは EGF-His および bFGF-His を共固定したスポットにおいて細胞増殖がとくに顕著であった。また，それら二つのスポット上の細胞は高頻度に nestin 発現し，分化マーカーを発現する細胞は少なかった。一方，CNTF-His を単独，あるいは共固定したスポットにおいて，アストロサイトへの分化が促進された。また，BDNF-His および IGF-1-His 固定スポットでは，比較的多くの細胞が神経へ分化した。

以上のように，サイトカインアレイを用いたパラレル分析の結果，神経幹細胞の増殖および分化を促進する環境に関して多くの有益な情報を得ることができた。これらの情報は，下記の神経幹細胞生存率向上のための材料設計において重要な基礎データとなった。

②接着ドメイン

ラミニンα鎖 G3 ドメインは，細胞接着に大きく関与していること，また，ラミニンα鎖の C 末端ペプチドが，G3 ドメインと細胞膜上のインテグリンとの相互作用に関与していることが知られている。そこで，ラミニンα１鎖 G ドメインとγ１鎖の C 末端ペプチドを組み合わせた細胞接着性キメラ蛋白質の設計を試みた。細胞接着性ドメインとして最適な最小構成単位の探索を狙い，ラミニンα

1 鎖の G ドメイン（LG）構造の異なるキメラ蛋白質を合成した(すなわち, LG1-3, LG1-2, LG3-5, LG3)。さらに，LG およびラミニンγ1 鎖の C 末端ペプチド（Lγ1c）には，コイルドーコイルによる二量体形成能を有するオリゴペプチド配列を導入して LG と Lγ1c の複合体を形成させた。

LG キメラ蛋白質と Lγ1c からなる複合体を基材上に固定し，その上で神経幹細胞を培養した。その結果，LG3-Lγ1c 固定表面上において，ラミニン吸着表面上の場合と同様に，神経幹細胞がよく接着し，よく伸展することが分かった。さらに，細胞の伸展度合を評価するため，各種表面上の接着細胞の面積を求めた。その結果, LG3-Lγ1c 固定表面上では，他の表面上に比べ，神経幹細胞がよく伸展し，その度合いは，ラミニン吸着表面上の細胞と同等であることがわかった。また，LG3-Lγ1c 固定表面への神経幹細胞の接着は，抗インテグリンα6 抗体および抗インテグリンβ1 抗体によって阻害されたことから，それらのインテグリン複合体が関与することが示唆された。

（３）神経幹細胞の生存率向上

上記の検討の結果，とくに，移植用材料として有効と考えられたコラーゲンおよびヒアルロン酸をベースとする材料に焦点を絞って研究を進展させた。

コラーゲンをベースとする場合には，コラーゲンに特異的に相互作用するドメイン（von Willebrand 因子の A3 ドメイン）を一成分とするキメラタンパク質を合成した。融合パートナーとしては，EGF を組み込んだ。このキメラタンパク質をコラーゲンゲル内に結合ドメインを介して複合化し，とくにその内部における神経幹細胞の増殖について調べた。

その結果，ゲル内部では神経幹細胞の生存が促進され，活発に増殖した。増殖した細胞の分化マーカー遺伝子（ネスチンおよびβ-チューブリン III）の発現をリアルタイム PCR 法によって定量した結果，ゲル内部の細胞の多くは神経幹細胞のマーカーであるネスチンを発現していた。

以上のことから，神経幹細胞の生存や増殖性を高めるハイドロゲル状のスキャフォールドには，細胞分裂の促進効果のある EGF を組み込むことが有効であることがわかった。また，ベース材料としてコラーゲンを用いると，ゲル化を利用した細胞の封入が容易で，かつ，コラーゲン結合性ポリペプチドを用いた制御因子の担持を効果的に行うことのできることがわかった。

一方，封入された神経幹細胞の生存をさらに向上させるには，スキャフォールド内部での細胞の接着状態を改善することが有効であると考えた。コラーゲンは神経幹細胞に対して比較的不活性であり，分散状態におかれた細胞はアポトーシスを起こしやすいと考えたからである。そこで，インテグリンと相互作用することが知られているラミニン由来の G3 ドメイン複合体あるいはその一部の活性ペプチドをコラーゲンゲル内部に担持させた。このゲルの内部では，細胞がインテグリンを介して接着することに起因して，細胞の生存率が培養細胞を用いた in vitro 試験および健常ラット脳における in vivo 試験の双方において向上することがわかった。

一方，ヒアルロン酸の場合は，予めキレート反応を利用して導入した金属イオンと，脳由来神経栄養因子（BDNF）に導入したヒスチジンタグとの間の錯体形成を利用して，ヒアルロン酸ゲル内部に担持させた。培養細胞を用いた評価ならびにラット脳内移植試験によって，ゲルの最適な組成，細胞の生存維持，機能ドメインの効果などについて知見を得ることができた。

以上のように，生体分解性ゲル内部における細胞の増殖性と接着性を向上させるための手法が確立された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）

1) M. Hiraoka, K. Kato, T. Nakaji- Hirabayashi, H. Iwata. Enhanced survival of neural cells embedded in hydrogels composed of collagen and laminin-derived cell adhesive peptide. *Bioconjugate Chem.* **20**, 976–983 (2009).

2) T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, H. Iwata. Surface-anchoring of spontaneously dimerized epidermal growth factor for highly selective expansion of neural stem cells. *Bioconjugate Chem.* **20**, 102–110 (2009).

3) H. Miyazaki, T. Maki, K. Kato, H. Iwata, Surface-displayed antibodies as a tool for simultaneously controlling the arrangement and morphology of multiple cell types with microscale precision. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 53–55 (2009).

4) T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, H. Iwata. Hyaluronic acid hydrogel loaded with genetically-engineered brain-derived neurotrophic factor as a neural cell carrier. *Biomaterials* **30**, 4581–4589 (2009).

5) 加藤功一, 岩田博夫: 蛋白質工学：蛋白質工学を利用したバイオマテリアルの分子設計．生体材料 **27**, 238–245 (2009).

6) T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, H. Iwata. Self-assembling chimeric protein for the construction of biodegradable hydrogels capable of interaction with integrins expressed on neural

stem/progenitor cells. *Biomacromolecules* **9**, 1411–1416 (2008).

7) T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, H. Iwata. Essential role of structural integrity and firm attachment of surface-anchored epidermal growth factor in adherent culture of neural stem cells, *Biomaterials* **29**, 4403–4408 (2008).

8) H. Miyazaki, K. Kato, Y. Teramura, H. Iwata. A collagen-binding mimetic of neural cell adhesion molecule. *Bioconjugate Chem.* **19**, 1119–1123 (2008).

〔学会発表〕（計 12 件）

1 中路　正，加藤功一，岩田博夫．移植神経幹細胞の生存率の向上にむけたラミニン由来ポリペプチド複合化基材の設計．第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 2009.11.16～17, 京都テルサ（京都市）

2) E. Y. Egawa, K. Kato, M Hiraoka, T. Nakaji-Hirabayashi, H. Iwata. Utilization of genetically engineered epidermal growth factor to construct collagen-based hydrogel carrier for promoting neural stem cell proliferation. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 2009.11.16～17, 京都テルサ（京都市）

3) 加藤功一，中路　正，小長谷周平，岩田博夫．表面提示のための機能性ポリペプチドの分子設計．第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 2009.11.16～17, 京都テルサ（京都市）

4) 加藤功一, Yuji Edgar Egawa，平岡真希子，中路　正，岩田博夫. キメラ蛋白質を用いたコラーゲン－神経幹細胞界面のデザイン，第 58 回高分子討論会, 2009.9.16～18, 熊本大学（熊本市）

5) 中路　正，加藤功一，岩田博夫．ラミニン由来ポリペプチドを利用した基底膜様基材の創製．第 58 回高分子討論会, 2009.9.16～18, 熊本大学（熊本市）

6) 加藤功一, 神経幹細胞機能制御のためのバイオインターフェース設計．情報バイオトロニクス研究会, 2009.6.19，東北大学（仙台市）

7) K. Kato, T. Nakaji-Hirabayashi, S. Konagaya, H. Iwata. Surface-anchoring of genetically-engineered growth factors onto substrates for their efficient presentation toward cells. 2nd International Symposium on Nanomedicine (ISNM2008), 2009.2.5–6, 岡崎コンファレンスセンター（岡崎市）

8) T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, H. Iwata. Self-assembling chimeric proteins for constructing cell adhesive hydrogels. Taiwan–Japan Symposium on Nanotechnology and Nanomedicine. 2008.10.30, Kyoto University (Kyoto)

9) T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, H. Iwata. Epidermal growth factor signaling at cell-substrate interfaces. 8th World Biomaterials Congress, 2008.6.28–7.1, Amsterdam

10) K. Kato, T. Nakaji-Hirabayashi, H. Miyazaki, M. Hiraoka H. Iwata. Biomaterials design by genetic engineering toward cell-based therapy for neurodegenerative diseases. 2007 International Conference on Bionano Sciences, 2007.12.5–7. The Howard International House (Taiwan)

11) 加藤功一，中路 正，宮崎寛子，平岡真希子，岩田博夫．中枢神経再生に向けた遺伝子組換え型バイオマテリアルの設計．第 29 回日本バイオマテリアル学会大会. 2007.11.26，千里ライフサイエンスセンター（大阪）

12) 加藤功一，宮崎寛子，寺村裕治，岩田博夫，コラーゲン結合性キメラタンパク質を用いた神経細胞の機能制御．第 36 回医用高分子シンポジウム，2007.7.30，上智大学（東京）

〔図書〕（計 1 件）

1) 松田晶二郎，加藤功一: 再生医療と高分子材料，『機能性繊維の最新技術』，白井汪芳 監修, 2009, CMC 出版，東京, pp. 194–207.

６．研究組織

(1)研究代表者

加藤　功一（KATO KOICHI）
京都大学・再生医科学研究所・准教授
研究者番号：50283875

(2)研究分担者

岩田　博夫（IWATA HIROO）
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：30160120