

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20085

研究課題名(和文) PEG脂質誘導体を用いた脳梗塞治療のための幹細胞ターゲティング療法

研究課題名(英文) Targeting of stem cells for stroke treatment using PEG-lipid derivatives

研究代表者

寺村 裕治 (Teramura, Yuji)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：10365421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞部位に結合するオリゴペプチドでヒトMSC表面を修飾することで、脳梗塞発症部位の集積効率を高め、MSCと損傷部位との細胞間相互作用により神経再生効果を向上させることを目的とする。脳梗塞発症部位では虚血にともない血管内皮細胞表面上に膜タンパク質が発現する。この膜タンパク質を標的とするオリゴペプチドをMSC表面に修飾することで、脳梗塞発症部位へのhMSCの効率的な集積が可能となると考えた。ここでは、膜タンパク質の一つであるE-selectinに着目し、これに対するオリゴペプチドを利用する。MSC表面へのpoly(ethylene glycol)結合脂質(PEG脂質)誘導体を利用する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化の進行に伴い、脳梗塞や脳出血に代表される脳血管障害は、日本人の死亡原因の中でも多くを占めている高頻度な疾患である上、後遺症によって介護が必要となる多くの後遺症に苦しむ脳梗塞患者に対して、自己骨髄由来の幹細胞(間葉系幹細胞(MSC))を用いて、細胞移植により機能回復を目指す画期的治療を効果的に推進できることが可能になる。

研究成果の概要(英文)：Promising cell therapies using mesenchymal stem cells (MSCs) is proposed for stroke patients. Therefore, we aimed to efficiently accumulate human MSC (hMSC) to damaged brain area to improve the therapeutic effect using poly(ethylene glycol) (PEG)-conjugated phospholipid (PEG-lipid) carrying an oligopeptide as a ligand, specific for E-selectin which is up-regulated on activated endothelial cells under hypoxia like stroke. Here we synthesized E-selectin-binding oligopeptide (ES-bp) conjugated with PEG spacer. We found that ES-bp can be immobilized onto the hMSC surface through PEG-lipid without influence on cell growth and differentiation into adipocytes and osteocytes, respectively. In addition, the modified hMSC can specifically attach onto E-selectin-immobilized surface as a model surface of activated endothelium, indicating the sufficient number of immobilized ES-bp onto hMSC. Thus, this technique is one of the candidates for hMSC accumulation to cerebral infarction area.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：細胞表面修飾 脳梗塞 MSC PEG脂質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化の進行に伴い、脳梗塞や脳出血に代表される脳血管障害は、日本人の死亡原因の中でも多くを占めている高頻度な疾患である上(年間 12 万人、死亡要因の 4 番目)、後遺症によって介護が必要となる(全医療費の約 1 割を負担)。本研究では、多くの後遺症に苦しむ脳梗塞患者に対して、自己骨髄由来の幹細胞(間葉系幹細胞(MSC))を用いて、細胞移植により機能回復を目指す画期的治療に取り組む。近年、脳梗塞患者に対する臨床試験が行われ、MSC を静脈注射により細胞移植することで、脳梗塞患者に良好な機能改善が認められることが報告され、リハビリテーション以外の選択肢しかなかった脳梗塞患者に対する新しい治療法として、MSC 移植は注目を集めている。患者本人の骨髄から MSC を分離して、培養・増殖させ(1か月以上)、静脈注射を行う簡単な治療であるため、治療としての展開が期待されている。しかしながら、臨床での良好な成績が報告されているものの、脳梗塞部位における MSC の機序やその治癒メカニズムについては、不明なことが多い。例えば、静脈注射した MSC は脳梗塞部位へ集積することを期待しているが、脳梗塞モデルラットでは、集積率は非常に低く、0.01%以下という結果である。また、脳梗塞部位へ集積したわずかな MSC は、神経再生や血管新生に直接効果があるのか、放出された液性因子が効いているのかについては不明である。つまり、ラットでは、およそ 10^6 個の MSC 細胞を移植して、せいぜい 100 個の細胞が脳梗塞部位へ集積している計算になり、その少ない細胞が脳梗塞部位で神経再生や血管新生に寄与していることが考えられているが、全くの推測である。わずか 100 個程度の MSC がどのように脳梗塞部位にて血管新生や神経再生に関与しているかは不明である。そのため、臨床での聖 k 石は必ずしも満足できるものではない。

2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞部位に結合するオリゴペプチドでヒト MSC (hMSC) 表面を修飾することで、脳梗塞発症部位の集積効率を高め、hMSC と損傷部位との細胞間相互作用により神経再生効果や血管新生を向上させることを目的とする。脳梗塞発症部位では虚血にともない血管内皮細胞表面上に膜タンパク質が発現する²⁾。この膜タンパク質を標的とするオリゴペプチドを MSC 表面に修飾することで、脳梗塞発症部位への hMSC の効率的な集積が可能となると考えた。ここでは、膜タンパク質の一つである E-selectin に着目し、これに対するオリゴペプチドを利用する²⁾。また、MSC 表面への短鎖ペプチドの導入にはスパーサーとして poly(ethylene glycol) 結合脂質 (PEG 脂質) 誘導体を利用する^{3,4)}。ここでは、MSC に導入した ES-bp-PEG 脂質の *in vitro* 評価について報告する⁵⁾。

3. 研究の方法

E-selectin に特異的に結合するオリゴペプチド (ES-bp: DITWDQLWDLMK) に N あるいは C 末端にシステインを導入した ES-bp を用いた。マレイミド-PEG 脂質 (PEG: 1, 5, 40 kDa) と ES-bp を反応させた。これを室温で 24 時間振とうし、システインとマレイミドを反応させることで ES-bp-PEG 脂質を得た。対照ペプチドとして、配列の異なる ConP (CGGGWKLDLTLDMIWQD) を利用した。

ES-bp-PEG 脂質に対する E-selectin の結合能を評価するために、水晶振動子マイクロバランス装置 (QCM-D) を用いた。1-dodecanethiol 溶液を用いて、センサー表面にメチル基を末端に有する自己組織化単分子膜(CH₃-SAM)を形成させた。その後、PEG 脂質誘導体(500 µg/mL)、bovine serum albumin (BSA) (1mg/mL)を流した後、E-selectin (5 µg/mL) を流した。

N 末端に蛍光標識 FITC を導入した FITC-ES-bp-PEG 脂質を用意し、hMSC の表面修飾を行い、蛍光光度計により 1 細胞当たりへの導入数の算出と共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメトリーによりその挙動を評価した。また、固定化した E-selectin に対する hMSC の接着能を調べるために、ES-bp-PEG 脂質で修飾した MSC あるいは非修飾の MSC を基板へ播種し、37°C で 15 分間静置した後、培地で十分にリンスして位相差顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

QCM-D により、ES-bp の N あるいは C 末端に結合した PEG 脂質に対して、E-selectin の結合評価を行ったところ、ES-bp の結合部位に関わらず、E-selectin に対する結合が見られた(Fig. 1)。N 末端と C 末端から結合した ES-bp 間では、E-selectin に対する結合量の違いは見られなかった。他方、コントロールペプチドでは、その結合が見られなかったことから、E-selectin と ES-bp-PEG 脂質の結合が特異的であることがわかった。

次に、FITC-ES-bp-PEG 脂質を用いて hMSC の表面修飾を行い、共焦点レーザー顕微鏡とフローサイトメトリーによる評価を行った。いずれの PEG 鎖長 (1kDa, 5kDa, 40kDa) の PEG 脂質を用いた場合でも hMSC の内部には蛍光は見られず、細胞膜表面にのみ FITC-ES-bp-PEG 脂質は観察された (Fig. 2)。また、hMSC の細胞表面に導入された ES-bp は、時間の経過とともに細胞表面から消失することが観察された。ES-bp の消失速度は、PEG 鎖長に関わらず、ほぼ同じ速度で細胞表面から脱離し、24 時間後には初期の導入量に対して 20%程度になることが分かった。また、

ペプチド導入数は、PEG 鎖長に関わらず、1細胞当たり、 10^8 から 10^9 ペプチド数であった。

また、E-selectin を基板表面に固定化し、活性化した血管内皮細胞のモデルとして利用し、hMSC の接着能を調べた。PEG スペーサーが 5kDa と 40kDa の ES-bp-PEG 脂質を修飾した hMSC では、播種後 10 分間以内に hMSC が接着していることが観察できた (Fig. 3)。特に、PEG 鎖 40kDa の場合では、hMSC の接着数が大幅に増加することが分かった。一方、無処理の hMSC あるいは PEG スペーサーが 1kDa の場合、播種後 15 分間以内に基板へ接着することは無かった。このことから、40kDa の ES-bp-PEG 脂質で hMSC を修飾することで、初期の接着を効果的に誘導できることが分かった。

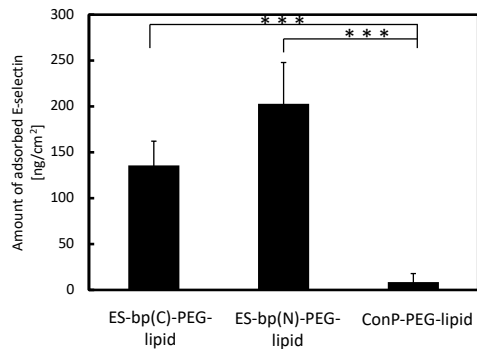


Fig. 1. QCM-D analysis of E-selectin-binding to ES-bp-PEG(5k)-lipid. ES-bp(C) or ES-bp(N) was conjugated to PEG-lipid at the C or N terminal.

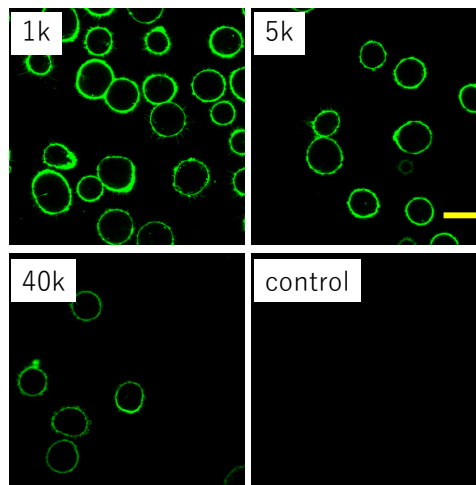


Fig. 2. Confocal microscopic observation of hMSC modified with FITC-ES-bp-PEG(1k, 5k, 40k)-lipid. The control is non-modified hMSC. Bar: 20µm

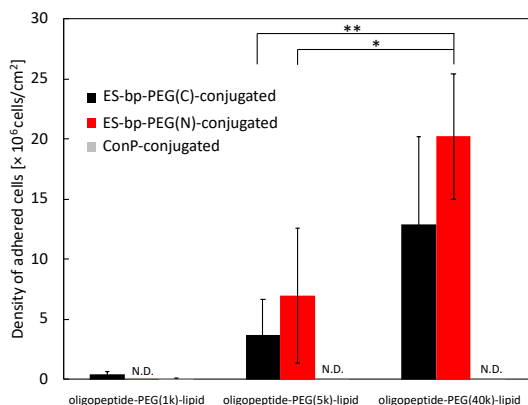


Fig. 3. Cell-binding assay of ES-bp-PEG(1kDa, 5kDa, 40kDa)-lipid-treated hMSCs onto E-selectin-immobilized surface. Quantitative analysis of the number of attached hMSC treated with ES-bp(C, N)-PEG-lipids with different PEG chains (1kDa,

4. 結論

脳梗塞発症部位に発現する E-selectin に対して、反応する ES-bp と PEG 脂質を利用することで、MSC の初期接着を誘導できることが示された。

REFERENCES:

- 1) O. Honmou, *et al. Brain*. **134**, 1790 (2011)
- 2) C. L. Martens, *et al. J Biol Chem*. **270**, 21129 (1995)
- 3) Y. Teramura, *et al. Soft Matter*. **6**, 1081 (2010)
- 4) Y. Teramura, *et al. Adv Drug Deliv Rev*. **62**, 827 (2010)
- 5) M. Noiri, *et al. J Biomed Mater Res A*. (2019) in press

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Makoto Noiri, Kenta Asawa, Naoya Okada ¹ , Tomonobu Kodama, Yuichi Murayama, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, Kristina N Ekdahl, Bo Nilsson, and Yuji Teramura	4. 巻 -
2. 論文標題 Modification of human MSC surface with oligopeptide-PEG-lipids for selective binding to activated endothelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res Part A	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.a.36697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kristina N Ekdahl, Karin Fromell, Camilla Mohlin, Yuji Teramura, Bo Nilsson	4. 巻 20
2. 論文標題 A human whole-blood model to study activation of the innate immune system triggered by nanoparticles as a demonstrator of toxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Technol Adv Mater	6. 最初と最後の頁 688, 698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1080/14686996.2019.1625721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sana Asif, Kenta Asawa, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, Bjorn Lindell, Robin Holmgren, Bo Nilsson, Anneli Ryden, Marianne Jensen-Waern, Yuji Teramura*, Kristina N Ekdahl.	4. 巻 -
2. 論文標題 Validation of an MPC polymer coating to reduce surface-induced cascade system activation in whole blood in in vitro and in vivo models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 e1800485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/mabi.201800485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 寺村裕治	4. 巻 75
2. 論文標題 細胞接着剤の調製と応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 高分子論文集	6. 最初と最後の頁 103, 115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1295/koron.2017-0052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 寺村裕治	4. 巻 75
2. 論文標題 細胞接着剤の調製と応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 高分子論文集,	6. 最初と最後の頁 103, 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1295/koron.2017-0052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 4件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 寺村裕治
2. 発表標題 臨床で役に立つ医工学研究を目指して - 細胞移植と臓器移植を中心に -
3. 学会等名 第69回医用高分子研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Teramura
2. 発表標題 Cell surface engineering using amphiphilic polymers for cell manipulation
3. 学会等名 Symposium for Crossing Borders in Medical Nanoscience and Biomaterials, Karolinska Institute, Stockholm(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺村裕治
2. 発表標題 高分子による細胞の表面修飾技術を利用して、細胞・臓器移植における免疫 反応の制御に挑む
3. 学会等名 第56回茨城地区活動講演会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuji Teramura
2. 発表標題 Cell surface engineering for biomedical application
3. 学会等名 Seminar series in Crossing-Borders, Karolinska Institute, Stockholm (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	児玉 智信 (Kodama Tomonobu) (70449932)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	