

令和 元年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2018

課題番号：17KK0130

研究課題名（和文）パーキンソン病細胞移植治療のための完全合成型生分解性ゲルの創製

研究課題名（英文）Development of Artificially-Synthesized Biodegradable Hydrogel for Cell-Based Therapy of Parkinson's disease

研究代表者

中路 正（Nakaji-Hirabayashi, Tadashi）

富山大学・大学院理工学研究部（工学）・准教授

研究者番号：10543217

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究課題では申請者の基研究課題（15J05353）の成果に基づき、『合成高分子』による細胞移植治療のための新規ゲル素材の開発を企図した。当初計画では、完全合成型を目指したが、生分解性、およびゲルの細胞毒性の問題から、共同研究者とのディスカッションを踏まえ、生体高分子を利用した半合成型インジェクタブルゲルの創製に変更した。ヒアルロン酸とヒアルロン酸結合ペプチドを導入したゼラチンによる二液混合型のゲルを創製した。このゲルは、チキソトロピー特性を有し常温でリバーシブルにゾル-ゲル転移をすることで、細胞毒性がないことが分かり、細胞移植用ゲル素材として大きな可能性を秘めた材料であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で開発したゲル素材は、パーキンソン病やその他難治疾患治療のための細胞移植医療において、強力な武器となる補助材料になると強く期待されるとともに、バイオマテリアル開発のコンセプトとして新たな選択肢を提供することにつながると考えられる。本研究開発は、社会的に貢献することに加え、学術的な発展にも寄与できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, I tried to develop a novel hydrogel using synthetic polymer based on the previous research about the development of injectable hydrogel (Young scientist research grant of JSPS, 15H05353). However, synthetic polymer-based hydrogel had the cytotoxicity and non-biodegradability in medium and aqueous solution containing specific enzyme. By the discussion with collaborators, Dr Thissen and Prof. Forsythe, I slightly changed the plan from using completely synthetic polymers to using semi-synthetic biopolymers. As the biopolymers, I chose a hyaluronic acid (HA) and denatured atelocollagen (gelatin, gela). And hyaluronic acid-binding peptides (HBP) were introduced to gela. Hydrogel constructed by mixing with HA and HBP-gela had a tixotropic property and the ability of reversible sol-gel transition at room temperature. Additionally, the viability of neural progenitor in this hydrogel were extremely high compared with that in control hydrogel.

研究分野：バイオマテリアル科学

キーワード：パーキンソン病 生体高分子 インジェクタブルゲル 合成型ゲル チキソトロピー特性

1. 研究開始当初の背景

中脳黒質に存在するドーパミン神経の変性・脱落により発症するパーキンソン病は、細胞移植による治療が検討されているが、移植細胞の生着率の低さや制御が不可能等の問題を抱え、未だ有効な治療方法となっていない。申請者は現状の問題点を克服すべく、**基础研究においてパーキンソン病態を劇的に改善できるゲルシステムを考案した**。具体的には、**図1**に示すようにブタ由来アテロコラーゲンに、**神経系細胞接着促進のためのキメラタンパク質**、**炎症・免疫応答を移植部位周辺でのみ鎮静化させる抗炎症性サイトカイン (IL10) 放出型キメラタンパク質**、**未成熟神経への誘導を促進する2種類の神経栄養因子を共担持させた**。さらに、**未成熟神経からドーパミン神経へ終分化させるための神経栄養因子徐放微粒子**を上記ゲルおよび細胞と共に移植するシステムである。**本システムの最大の特徴は「細胞が必要とする時にのみタンパク質が作用する」という作用時機規定能**であり、例えば、**脳内の免疫細胞であるミクログリアの活性化時のみ IL10 キメラタンパクが放出される**(**図1左下**)。また、**移植細胞が未成熟神経へ誘導された時のみ必要となる神経栄養因子が選択的に微粒子から放出される**(**図1右下**)。

これまでに、パーキンソン病ラットを用いた病態改善評価において、本ゲルシステムの利用により劇的な改善が認められた。**先行研究との最大の差は、免疫抑制剤を使用することなく、また一回の移植手術のみで、移植後15週において直進歩行が可能になったという点である**。この世界初の成果は関連研究に大きなインパクトを与えるものである。事実、2017年9月には、チェコ共和国実験医学研究所において招待講演を行うなど、国内外から高い関心を得ている。基础研究では、本システムがドーパミン神経ネットワークを脳内で再構築するメカニズムの解明に取り組みつつ、本ハイドロゲルの改良に着手すべく本研究課題の立案に至った。

その理由として、開発を進める中で、国内外の著名研究者らより、本ゲルシステムの有効性を高く評価される一方で、**臨床応用のために合成材料(代替材料)も検討すべきである**との助言を得たことに起因する。これは、**アテロコラーゲンの分解産物が炎症を惹起する可能性があること**、**またアテロコラーゲンがブタ由来である(異種移植)であること**、**加えてヒト由来材料は供給量・コスト面に制限があるため**という点が挙げられる。そこで、これらの問題点を解決し、早期臨床応用を実現すべく、**生体親和性かつ生分解性を有する合成高分子ゲルの設計・開発を企図した**。

2. 研究の目的

生体親和性を有する双性イオン型(側鎖に正負両電荷を有する)高分子〔原著 2, 3, 4, 8〕をベースとし、**新たに考案したオリゴペプチドを側鎖に有する機能高分子を用いたインジェクタブルゲルの開発**を目的とした(**図2**)。考案したオリゴペプチド(側鎖)は**ミクログリア(脳内環境を調整する免疫担当細胞)が産生する酵素で切断されるユニットとαヘリックスコイルドコイル(図2A)を形成するユニットから構成されるため、オリゴペプチドのヘテロ二量化による「ゲル化能」および酵素による「分解能」の2つの役割を果たすことが期待される**。

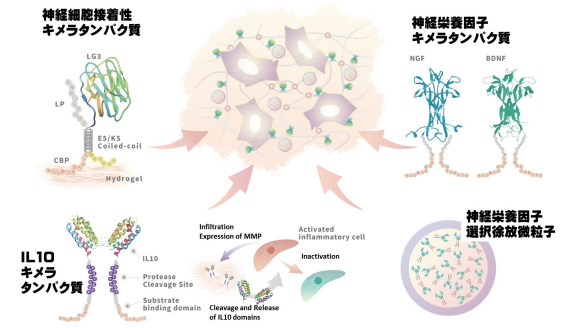


図1. パーキンソン病治療のための細胞移植で併用するゲルシステムの各機能。

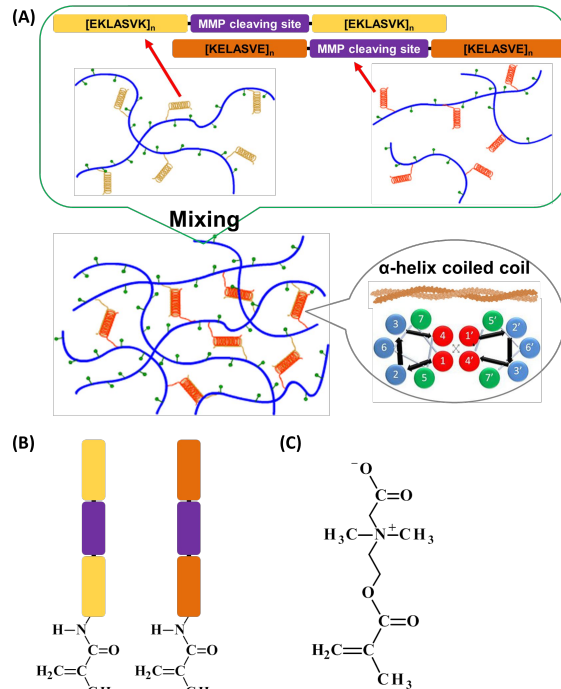


図2. (A) 生分解性合成高分子ゲル. 2種類のαヘリックスペプチドを側鎖に有する高分子を混合することで、コイルドコイルを形成(黄部分と橙部分でヘテロ二量化)しゲル化する。このペプチドには、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)切断サイト(紫)が導入されており、MMPによる切断でゲルが分解する。双性イオン型高分子をベースとしていることから、炎症惹起や毒性発現がなく免疫細胞に貪食され消失すると期待できる。候補とするMMPは、脳内リモデリング時に産生されるMMP1またはMMP6とする。(B) オリゴペプチド修飾モノマーの構造、(C) 双性イオン型モノマーであるカルボキシメチルペルタイン(CMB)の構造。

3. 研究の方法

<ペプチド修飾モノマーの合成>

Dr. Thissen が確立したペプチドモノマー合成法を利用し、Dr. Thissen と共同してオリゴペプチド修飾モノマー (図 2B) を大量かつ高純度で得る。

<ゲル前駆ポリマーの合成・評価>

オリゴペプチド修飾モノマー (図 2B) と CMB (図 2C) の共重合体を得る。材料最適化において分子量分布の狭い高分子の方が評価しやすいと考えられ、リビングラジカル重合での合成も検討する。

<ゲルの構築・特性評価>

ゲルの材料学的・物性的評価は、Dr. Thissen と共同で実施する。一方、生体外における生物学的評価 (細胞実験等) は、Prof. Forsythe が考案したインジェクタブルゲルの評価技術を利用し、Prof. Forsythe と共同で実施する。さらに、動物実験による分解挙動・安全性 (分解産物の体内動態等) 評価は、申請者の所属研究機関で実施する。

<ペプチド修飾モノマー合成・ゲルの構築および物性的評価>【CSIRO】

Dr. Thissen らが確立したペプチド修飾モノマーの合成法 (高収率・高純度) を用いる。合成法の技術提供をしてもらい、共同して大量にモノマーを得る。また、ゲルの物性的評価では、実用化に向けて不可欠な情報となる評価法の伝授を受けながら進める。

<ゲルの生物学的評価>【モナッシュ大】

神経前駆細胞や未成熟神経細胞を用いて、細胞毒性の有無、ゲル中での神経伸長・遊走挙動、分化誘導等を評価するが、Prof. Forsythe が考案した評価技術を利用し共同で行う。モナッシュ大・CSIRO の細胞研究センターや Monash MedTech などの共用設備も活用しつつ、細胞免疫染色やタンパク質発現解析 (ウェスタンブロッティング・酵素免疫測定)、遺伝子発現解析を駆使し、それらの結果を前駆ポリマー合成およびゲル構築にフィードバックし最適化を図る。

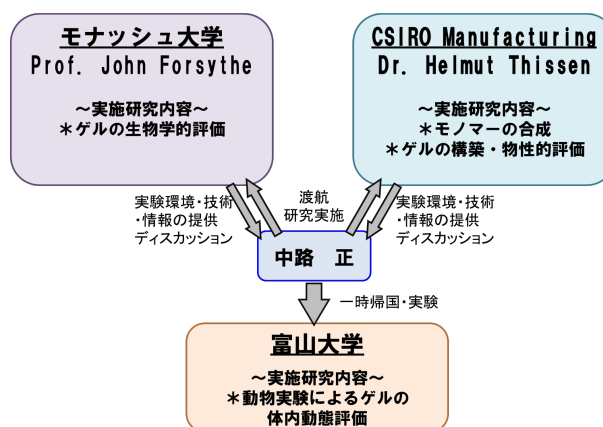


図 3. 本共同研究の体制図。

4. 研究成果

まず初めに、若手研究 A の中で進めてきた、細胞挙動と材料の化学的・物理学的特性との相関関係の調査において明らかになった知見を踏まえ、またその研究で用いていた双性イオン型高分子を利用したハイドロゲルの創製を目指した。双性イオン型高分子をゲル化させるために、ヘリックスコイルドコイルを形成するペプチドを側鎖に有するモノマーを固相合成法により合成し、双性イオン型モノマーおよびペプチドモノマーを共重合させ、2 種類のゲル前駆ポリマーを得た。それらの前駆ポリマーを用いてゲル化評価を行ったところ、目的通り比較的強固なゲル (5 ~ 8 MPa) になることが分かったが、このゲルに MMP を反応させ分解させようと試みたがほとんど分解せず、生分解性を示さなかった。この理由として、コイルドコイル形成ペプチド配列の間に MMP 切断サイトを導入した設計としたが、コイルドコイル形成に伴って、切断配列が MMP と反応できなくなったため、もしくは、2 本のペプチドの内 1 本の MMP 切断サイトが切断されてももう一方が切断されないためと示唆された。また、神経成長を促進する YIGSR 配列を側鎖に有するペプチドモノマーを合成し、ゲル前駆ポリマーに導入した。そしてゲル化させ、そのゲル内での神経前駆細胞の挙動を評価した結果、細胞毒性と思われる細胞死が観察された。この理由については明確には判断できないが、前駆ポリマーの何らかの作用によるものではないかと推察された。

前述の理由から、共同研究者である Dr. Thissen および Prof. Forsythe とのディスカッションを行い、完全合成型は、最終的に生体内に残る可能性が捨てきれないという点も鑑み、半合成型に方針を転換すべきとなった。しかしながら、半合成型インジェクタブルゲルの優位性を示すために、完全合成型ゲルをネガティブコントロールとして使用する方針となり、完全合成型ゲルの開発と同時進行で半合成型インジェクタブルゲルの開発を進めることとした。

半合成型インジェクタブルゲルは、ベース高分子として、テロペプチドを除去した変性コラーゲン (gelatin, Gela) に固相合成法により得たヒアルロン酸結合ペプチド (HBP) を担持させ、HPB-modified gelatin (HPB-Gela) とヒアルロン酸を混合し、HBP とヒアルロン酸 (HA) との相互作用により架橋しゲル化させるという設計である。HBP を担持させるため、Gela にマレイミド基 (MI) を導入し、末端に Cys を有する HBP と反応させた (図 4)。続いて、固相合成した HBP-Cys を反応させ、HPB-Gela を得た。

MI を導入した Gela は、1 本の Gela 当たり 7.6 ± 1.9 残基 (MI₈-Gela)、 15.2 ± 1.5 残基

(MI₁₅-Gela), および 19.7 ± 1.2 残基 (MI₂₀-Gela) の 3 種類を合成した (MI の導入率は ¹H NMR により決定)。それぞれの MI_n-Gela に HBP を反応させた後, MI の NMR ピークが消失していたことから, ほぼすべての MI に HBP-Cys が反応したものと判断した (HBP₈-Gela, HBP₁₅-Gela, HBP₂₀-Gela)。

合成した HBP₈-Gela, HBP₁₅-Gela, HBP₂₀-Gela と HA を混合した結果 HBP₈-Gela については, どのような混合比にしてもゲル化が認められなかった。一方で, HBP₂₀-Gela と HA を混合した場合, 凝集体が形成し沈殿してしまっ。HA と Gela を混合しても沈殿が起こらないことから, HBP が多数存在することにより架橋率が高すぎるため, 凝集・沈殿が起こったものと推察される。そこで HBP₁₅-Gela を中心に様々な濃度比で混合した場合のゲル化評価を行った。

一般的にゼラチンは 7 ~ 10% でゲル化するといわれており, 抗原認識部位を取り除いたアテロゼラチンにおいては, さらに高い濃度でゲル化するといわれている。一方, ヒアルロン酸は数% で非常に柔らかいゲルになることが知られているが高硬度のゲルは形成しないこと, また 1% を超えると粘性が高すぎて非常に扱いづらいことが知られている。そこで粘性も低く扱いやすい低濃度でのゲル化を念頭に条件探索を行った。

図 5 に示すように 0.75% HA および 0.5% HBP₁₅-Gela の混合時, および 0.8% HA および 0.4% HBP₁₅-Gela 混合時において, 完全なゲル化が認められた。加えて, 本研究開発で目指すチキソトロピー特性の発現を簡易的に調査した結果, 目的通り物理的な刺激により流動し, 再び静置すると 30 ~ 60 sec でゲル化することが示された。これは, これまでに報告されたことがない「生分解性」「生体親和性」を有し, 且つ「チキソトロピー特性」を持つリバーシブルインジェクタブルゲルであるといえる。

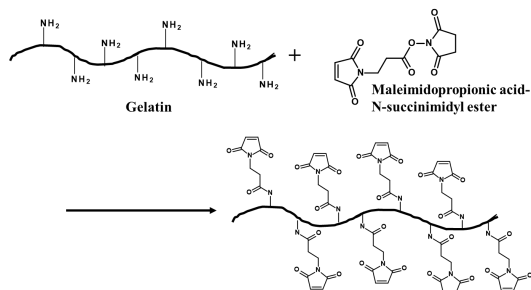
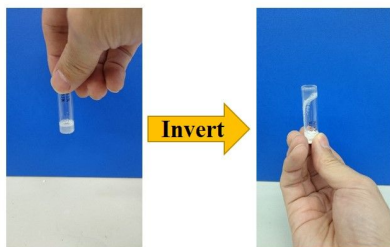
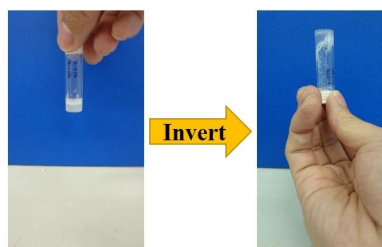


図 4 . MI-modified Gela の合成スキーム .

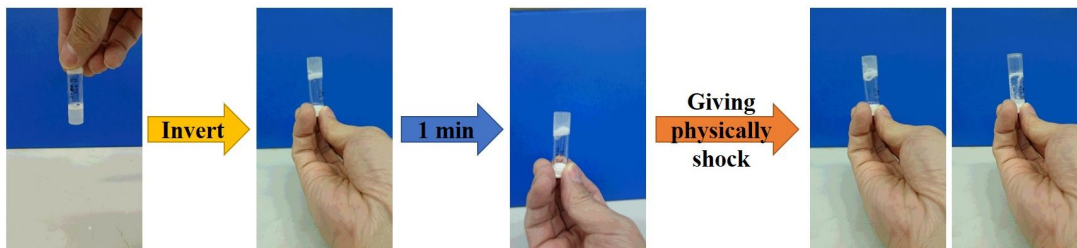
0.5% HA + 0.5% HBP-Gela



0.5% HA + 1.0% HBP-Gela



0.75% HA + 0.5% HBP-Gela



0.80% HAc + 0.4% HBP-Gela

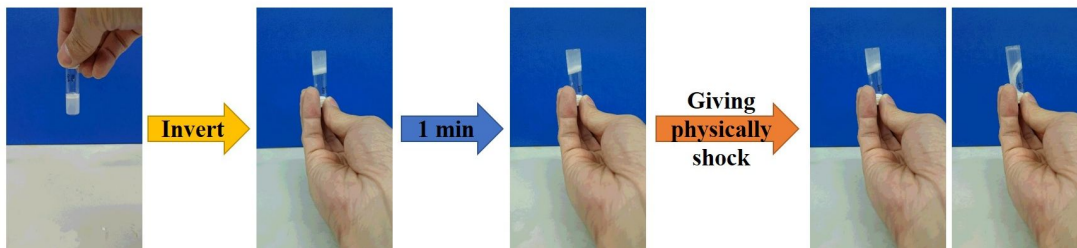


図 5 . HBP₁₅-Gela と HA の混合ゲルの挙動観察 . 混合し 30 sec 後に反転させ, ゲル化しているかを観察し, そのまま 1 min 以上静置して流動しないことを確認した後, 強い物理的な衝撃を与えて再流動することを調査した .

このゲル素材について, 神経前駆細胞の生存率を評価した。本評価では細胞接着足場として機能させるため, HBP₁₅-YIGSR₅-Gela と HA の混合ゲルを使用し, ネガティブコントロールとして, コイルドコイル架橋型 YIGSR 担持完全合成型ゲルを用いて評価した。その結果, 眼前合

成型ゲル中で 1 週間培養した神経前駆細胞の生存率は $52.3 \pm 9.2\%$ であったのに対し、HBP₁₅-YIGSR₅-Gela と HA の混合ゲル中の細胞の生存率が $91.2 \pm 3.3\%$ であることが分かり細胞毒性はないものと判断された。

本研究課題では、材料の設計変更もあり成果として発表するに至る実験結果が未だ不足している現状にある。特に粘弾性・チキソトロピー特性の定量的な評価、含水率および生分解速度の評価が未達成である。そのため引き続き研究を進め、2019 年度中に国際論文誌での成果発表を目指すとともに、当該研究者のオリジナルであるタンパク質アンカーリング技術と融合して、細胞制御インジェクタブルゲルへ拡張させ、細胞移植用補助ゲルとしての性能評価を実施していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

* 現在以下の論文を投稿準備中である。

- [1] T. Nakaji-Hirabayashi*, J. Forsythe, H. Thissen*, Novel biodegradable and injectable thixotropic hydrogel for cell-transplantation therapy, *Submit to Biomaterials*, 2019.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ: <http://nakaji-lab.net/>

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：ヘルムート・ティッセン

ローマ字氏名：Helmut Thissen

所属研究機関名：オーストラリア連邦科学技術産業研究機構(CSIRO) Manufacturing

部局名：Department for Biomaterial Interface Science

職 名：Project Leader

研究協力者氏名：ジョン・フォーサイス

ローマ字氏名：John Forsythe

所属研究機関名：モナッシュ大学

部局名：Department of Materials Science and Engineering

職 名：Associate Professor

〔その他の研究協力者〕

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。