

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04528

研究課題名(和文)脳梗塞後の炎症と再生を制御するペプチド分子集合体材料の創製

研究課題名(英文)Creation of self-assembled peptide regulating inflammation and regeneration after ischemic brain stroke

研究代表者

味岡 逸樹(Ajioka, Itsuki)

東京医科歯科大学・統合研究機構・准教授

研究者番号：10348790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症抑制性サイトカインIL-10に着目し、脳梗塞発症3日後にIL-10を損傷脳内に持続供給することで、マウス脳梗塞で生じる歩行機能障害の回復効果を検証した。はじめに、従来知られている超分子ペプチドゲルよりも徐放効果の高いJigsaw-shaped self-assembling peptide (JigSAP)を開発し、IL-10を徐放させる技術を確立した。脳梗塞モデルマウス実験では、炎症抑制効果があることを見出したが、予想に反して、脳梗塞後の歩行機能障害を悪化させるという結果を得た。本研究成果は脳梗塞後の炎症持続が組織修復を促進する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

JigSAPは低免疫原性の短いアミノ酸からなる両親媒性ペプチドであり、タンパク質を約1週間かけて放出することのできる新規超分子ペプチドゲルであり、まずは亜急性期脳梗塞の「細胞フリー再生治療医薬品」への展開を目指す。また、炎症抑制が脳梗塞後の回復を悪化させるという本研究のデータは、炎症制御による脳梗塞治療の難しさを示した一方で、標的細胞を同定する等の今後の研究の発展によって、新たな医薬品開発につながる可能性も考えられる。

研究成果の概要(英文)：This research focused on the anti-inflammatory cytokine IL-10, reported to promote tissue repair following an ischemic stroke via reverse genetic studies. We evaluated the recovery effect of IL-10 on sensorimotor function impairment resulting from ischemic stroke. First, we developed a jigsaw-shaped self-assembling peptide (JigSAP), a sustained-release system superior to the conventional supramolecular peptide hydrogels. We then utilized it to establish the sustained release of IL-10. In the mouse stroke model, we found that IL-10 slow-release exhibited an anti-inflammatory effect. However, contrary to expectations, the results indicated an aggravation of sensorimotor function impairment post-stroke. Our research suggests the possibility that persistent inflammation post-stroke may promote tissue repair, adding complexity to the understanding of the role of IL-10 in post-stroke recovery.

研究分野：生体材料学

キーワード：超分子ペプチドゲル サイトカイン 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

急速な少子高齢化の進む先進諸国において脳梗塞の治療法開発は喫緊の課題となっている。損傷した脳は再生しないと長く考えられていたが、申請者らを含む神経生物学研究の発展により、脳の潜在的再生能力が明らかとなってきた。申請者らは最近、脳の潜在的再生能力を発揮させるためのバイオマテリアルを開発し、脳梗塞 7 日後での脳内単回投与でマウス脳梗塞モデルの運動機能回復を担う材料開発にも成功した。しかしながら、発症 1 日後から 7 日後までに介入できる技術開発も並行して必要不可欠とされている。

2. 研究の目的

発症 7 日後までに脳梗塞予後を左右するのが炎症反応制御だとも考えられているため、本研究では、損傷組織の修復を担う抑制性 T 細胞が分泌し、逆遺伝学の介入実験で重要性が証明されているサイトカイン IL-10 に着目し、脳梗塞急性期に IL-10 を損傷脳内に供給することで、神経血管再生や脳梗塞の機能回復を促進するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

以下の方法で検討した。① 脳梗塞後の炎症反応を制御する IL-10 徐放性ペプチド集合体の創製 (材料創製)、② IL-10 徐放性材料の炎症反応制御評価 (in vivo 評価実験)、③ マウス脳梗塞モデルの機能回復評価 (in vivo 介入実験) で検証した (②と③データは再提出日までに記載してアップデートする)。

4. 研究成果

(1) 11 アミノ酸からなる JigSAP (Jigsaw-shaped Self-assembling peptide) の開発

短いアミノ酸からなり、中性でゲル化し、タンパク質の取り込みと徐放を達成する新規 11 アミノ酸からなるペプチド (Ac-RIDARMRADIR-NH₂) JigSAP を開発した (図 1a-d)。JigSAP は、凹凸を持つ組木状の疎水面を有しており、合致する凹凸部との選択的疎水性相互作用と、水素結合による β シート形成によって自己選択的に一次元集積する。凹凸状疎水面は、グリコホリン A などのホモ二量体蛋白質に広く見られる構造であり、その特徴的な構造モチーフである AXXXA 配列や GXXXG 配列は、 α ヘリックスから β ストランドへとコンフォメーション変化することが知られている。実際に JigSAP は、水中でヘリックスから β シートへの構造変化を示してゲル化し、この動的変化と並行して粘弾性も増加した (図 1e-h)。JigSAP はこの動的特性のため、溶解直後

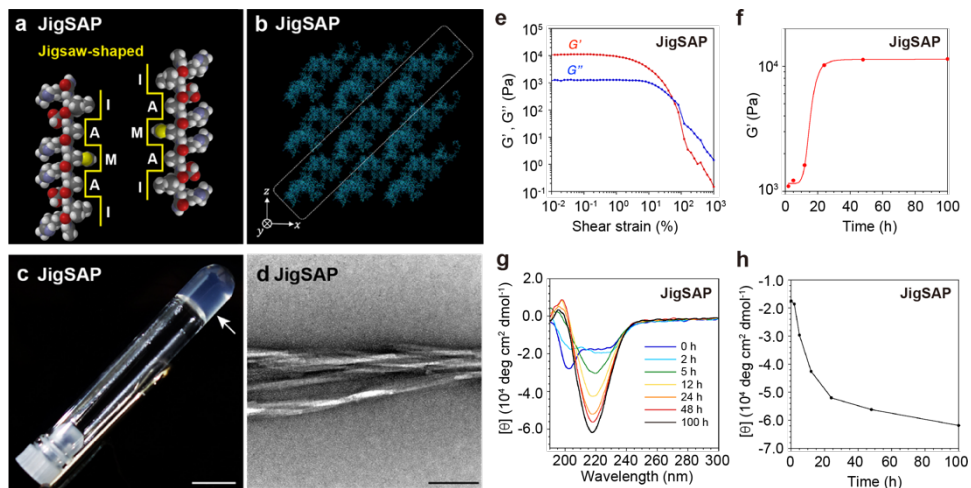


図 1: JigSAP によるハイドロゲル形成

a, Ac-RIDARMRADIR-NH₂ (JigSAP) の空間充填モデル。凹凸状の疎水性表面を示す。b, MD シミュレーションにより得られた JigSAP の水中超分子構造のスナップショット。c, 37°C で 48 時間培養した JigSAP の写真 (ペプチド濃度: 1.0 wt%, pH 7.4)。矢印はハイドロゲルを示す。d, JigSAP の透過型電子顕微鏡写真。e, f, JigSAP の貯蔵弾性率 (G' , 赤) と損失弾性率 (G'' , 青) の時間変化。g, h, JigSAP の円二色性 (CD) スペクトル。h, JigSAP の CD シグナル強度の時間変化 (217.6 nm)。

に脳内投与しやすい柔らかさを有している点が特徴である。

また、JigSAP の細胞接着能を 3T3 細胞を用いた細胞接着実験で検討し、(RADA)4 (=RADA16) と同等の細胞接着能を有していることが判明した (図 2)。

(2) JigSAP ゲルからの修飾タンパク質徐放効果の検討

JigSAP 配列を付加したタンパク質の吸着と徐放を評価するために、緑色蛍光タンパク質 EGFP を用いて検討した。吸着に関しては、従来の (RADA)4 配列を付加した場合と同様に JigSAP 配列の付加でゲルへの取り込み効率が顕著に増加したが、放出に関しては従来の (RADA)4 配列タグの 10 倍以上のタンパク質を約 1 週間かけて徐放することが判明し、吸着と放出の起こりやすい分子設計に成功した。以下に IL10 を徐放材料の概要図を示す。

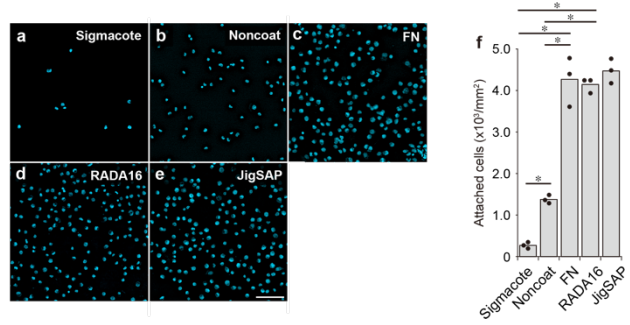
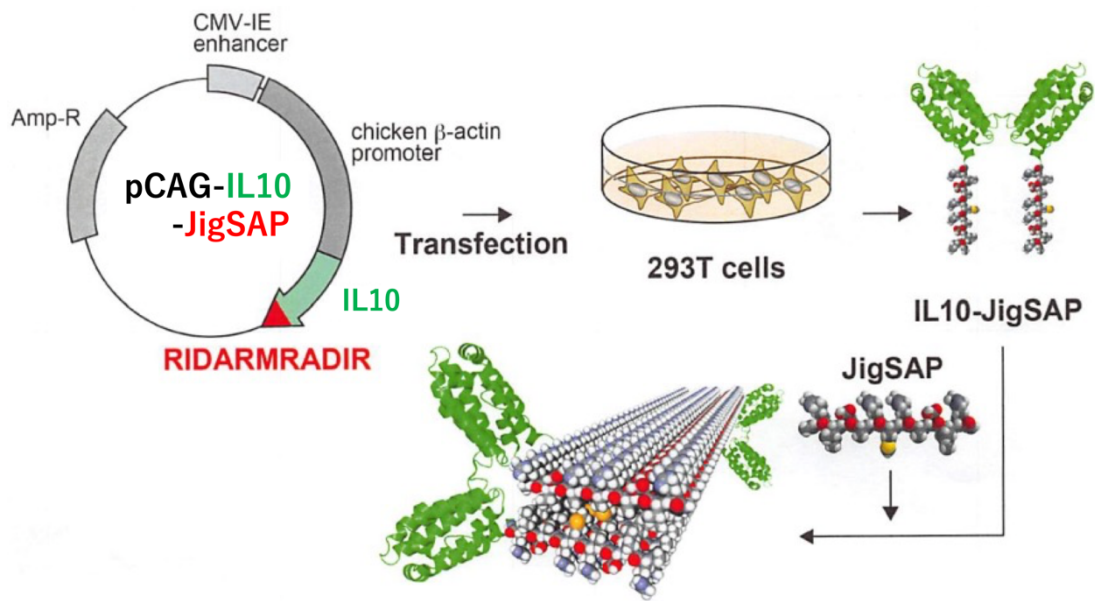


図 2: JigSAP ペプチドの細胞接着性
a-e, Sigmacote (a), 非コート対照 (b), Fibronectin (FN) (c), RADA16 (d), JigSAP (e) でコートしたチャンバースライドに接着した線維芽細胞の DAPI 蛍光像. f. 接着した線維芽細胞の細胞数. * $P < 0.05$



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yaguchi Atsuya, Oshikawa Mio, Watanabe Go, Hiramatsu Hirotsugu, Uchida Noriyuki, Hara Chikako, Kaneko Naoko, Sawamoto Kazunobu, Muraoka Takahiro, Ajioka Itsuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Efficient protein incorporation and release by a jigsaw-shaped self-assembling peptide hydrogel for injured brain regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26896-3	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 味岡 逸樹, 村岡 貴博, 渡辺 豪
2. 発表標題 超分子ペプチドの設計と脳梗塞の再生治療
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 味岡 逸樹, 矢口 敦也, 押川 未央, 渡辺 豪, 村岡 貴博
2. 発表標題 VEGFを徐放する超分子ペプチドの開発と亜急性期脳梗塞の再生治療
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Itsuki Ajioka, Takahiro Muraoka, Go Watanabe
2. 発表標題 Viscoelasticity-modulated supramolecular peptides for regenerative medicine of ischemic stroke
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Itsuki Ajioka
2. 発表標題 Artificial Scaffolds Mimicking the Extracellular Environment of Developing Brain
3. 学会等名 the 16th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 味岡 逸樹、村岡 貴博、渡辺 豪
2. 発表標題 神経と血管の相互作用を人為操作する超分子ペプチド材料
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター・味岡研究グループ
<https://www.tmd.ac.jp/cbir/1/ajioka/>

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------