

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300164

研究課題名（和文）神経前駆細胞の機能制御のためのモジュール化バイオマテリアルの設計

研究課題名（英文） Design of modular biomaterials for the functional control of neural progenitor cells

研究代表者

加藤 功一（KOICHI KATO）

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：50283875

研究成果の概要（和文）：神経前駆細胞の機能制御が可能なバイオマテリアルの設計を目的として、まず、ラット胎児脳由来神経前駆細胞に対して各種の細胞制御因子（細胞増殖因子、神経栄養因子、細胞接着分子リガンドなど）を単独あるいは複合化して作用させ、細胞増殖や分化に与える影響について系統的に調べた。これによって、細胞制御因子に対する細胞の応答様式に関する知見を得た。また、これらの細胞制御因子を生体材料への実装するため、基材親和性をもつペプチドと融合した。これらのモジュールを用いて創製されるバイオマテリアルが、神経系細胞の生存や分化を的確に制御できることを示した。

研究成果の概要（英文）：In an attempt to design biomaterials capable of controlling functions of neural progenitor cells, various protein factors, such as growth factors, neurotrophic factors, integrin ligands, etc., were tested alone or in combination of these factors for their ability to control proliferation and differentiation of neural progenitor cells obtained from the rat fetal brain. These experiments provided systematic information on the effects of various protein factors. Attempts were also made to design modular factors that carried a fused peptide having an affinity for base materials as cell carriers. It was demonstrated that survival and differentiation of neural progenitors could be suitably controlled in cell carries incorporating modular factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生体材料学

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：タンパク質工学、中枢神経、再生医療、神経幹細胞、移植補助材料、細胞チップ、コラーゲン、細胞増殖因子

1. 研究開始当初の背景

◆神経前駆細胞の機能制御

神経前駆細胞は、中枢神経の再生医療にと

って重要な細胞ソースである。ヒト iPS 細胞の樹立によって、神経前駆細胞を用いた再生医療にますます期待が寄せられるようになった。しかし、この再生治療を実現させるに

は、移植細胞の調製法や移植後の細胞の機能制御法の確立など解決しなければならない課題も多い。従来から、細胞増殖因子や神経栄養因子などの様々な細胞制御因子の神経前駆細胞に及ぼす影響について調べられてきたが、神経前駆細胞の分化や生存をコントロールすることは、決して満足できる技術レベルには達していなかった。

◆ポストゲノム時代におけるバイオマテリアル設計

ゲノム計画の終結の後、生物学の分野ではゲノミクス研究が幅広く行われるようになった。また、IT技術の発展に伴って、細胞の挙動に関する数理モデルを構築し、その動的な振る舞いを解析することが可能になった。我々は、これらのポストゲノム研究によって生み出される生体分子ネットワークに関する情報を、バイオマテリアルの設計に有効活用したいと考える。

我々は以前から、ゲノミクス研究の一環として、細胞チップを用いた遺伝子・タンパク質のハイスループット機能解析を行ってきた。例えば、多種類の転写因子のそれぞれを血管内皮前駆細胞内で発現させて細胞分化に及ぼす影響を調べたり、多種類の細胞外マトリックスやサイトカインを神経幹細胞に作用させ、細胞の分化方向に及ぼす影響について調べた。この細胞チップ分析法を用いれば、様々な細胞制御因子に対する細胞の応答を定量的に捉えることができるため、生体材料設計指針の明確化と評価が可能になると考えた。

◆次世代の組織工学用材料

1980年代から組織工学に関する研究が盛んに行われてきた。生体分解性材料を巧みに利用することで、骨、軟骨、皮膚などの組織再建が可能になった。さらに、細胞シート工学のような組織構築をガイドする手法の導入によって、心筋や角膜を再建するための移植組織を調製する技術も発達した。また、歯のような器官の再生も可能になりつつあった。そこで、次なる組織工学のターゲットとして、内分泌組織や神経組織のように、高度な機能と適所においてホスト組織とインターラクティブであることが要求される組織の再生に注目が集まってきた。生体材料と幹細胞とを利用して組織の再生を図る試みが行われているが、それには細胞の接着・増殖・分化・移動・ホスト組織への統合と機能発現など、様々な細胞機能を時空間的に制御することが求められる。このような高次元の細胞制御には、多様なシグナル（細胞増殖因子、モルフォゲン、ケモカインなど）が時空間的に制御されながら協同的に働く必要があると考えられた。

◆モジュール設計によるバイオマテリアルの構築

蛋白質による分子認識は複雑な生体システムの鍵を握る。したがって、バイオマテリアルを用いて生体システムを制御するには、蛋白質をその構成要素として組み込むのがもっとも合理的である。このような考えのもと我々は、神経幹細胞の増殖や生存を制御するための蛋白質組み込み型バイオマテリアルの開発を行ってきた。ガラス基板や生体高分子ゲルなどのベース材料に各種のサイトカインや細胞接着分子を組み込むため、それらの蛋白質とベース材料親和性ペプチドとのキメラ蛋白質を合成した。このような手法で作製されるバイオマテリアルは、神経幹細胞の選択的増殖を可能にしたり、神経幹細胞の生存を助けることについて報告してきた。本研究では、このようなキメラ蛋白質を様々な細胞制御因子と様々なベース材料親和性ペプチドから合成し、バイオマテリアル構築の「モジュール」として利用する。これによって様々な要求に応じて、複数の因子を同一の温和なケミストリーでベース材料に組み込むことが可能になるとの発想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、生体内あるいは生体外において神経前駆細胞の高度な機能制御が可能な細胞制御因子組込型バイオマテリアルの創製を目的とした。合理的な材料設計を行うため、まず、神経前駆細胞が様々な細胞制御因子にもとづく刺激に対してどのように振舞うかについて調べた。これにはハイスループット細胞チップ分析法を駆使し、細胞分化や生存への影響、転写因子ネットワークの応答、個々の因子の協同性に関する情報を得ることを試みた。これらの情報をもとに、ある分化系譜へのコミットメントや細胞の生存維持など、特定の目的を達成するのに最適な制御因子カクテルを選定した。次に、それらの制御因子群をベースとなるバイオマテリアルに組み込む手法について検討した。ここでは、様々な要求に応じて複数の細胞制御因子を定量的かつ効果的に組み込むことを可能にするため、制御因子のモジュール化、および、それらのモジュールのベース材料への組み込み法の確立に取り組んだ。以上の研究を通じて、ゲノミクスに立脚したバイオマテリアルの合理的設計法とその構築手段の開拓を目指した。

3. 研究の方法

◆多様な複合因子に対する細胞応答解析

各種の細胞制御因子を単独あるいは複合化して配列固定された細胞チップを用い、それらの因子が、胎児脳に由来する神経前駆細胞からグリア前駆細胞、オリゴデンドロサイ

ト、成熟神経細胞などへの分化に及ぼす影響を調べた。

◆最適制御因子の生体材料への実装

各種の制御因子を必要とする細胞種に応じてベース材料に組み込むため、ベース材料に対して親和性をもつペプチドとのモジュール化因子を合成した。ベース材料としてコラーゲンを取り上げ、モジュール化因子の合成には大腸菌発現系を用いた。モジュール化制御因子とコラーゲンとを複合化したバイオマテリアルを作製し、その材料が神経分化制御に有効であるかについて細胞培養系および脳内移植系において評価した。

4. 研究成果

◆神経前駆細胞の増殖因子応答解析

神経前駆細胞が様々な細胞増殖因子に対してどのように振舞うかについて調べることを目的に、細胞チップ分析法を用いたバイオアッセイを行った。5種類の細胞増殖因子(EGF、bFGF、CNTF、BDNF、IGF-1)を単独あるいは2つの組み合わせとしてディスプレイした細胞チップを作製した。これには、タンパク質工学および基材の微細加工技術を利用した。このようにして作製したチップ上でラット胎児脳由来神経幹細胞を培養した。一定期間の培養後、4種類の分化マーカー

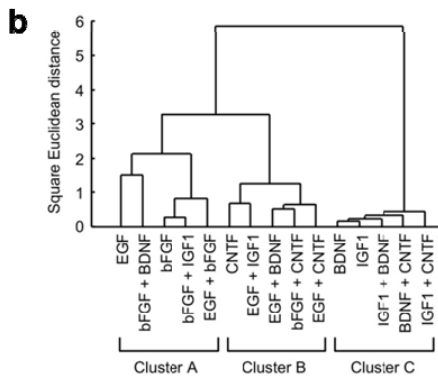
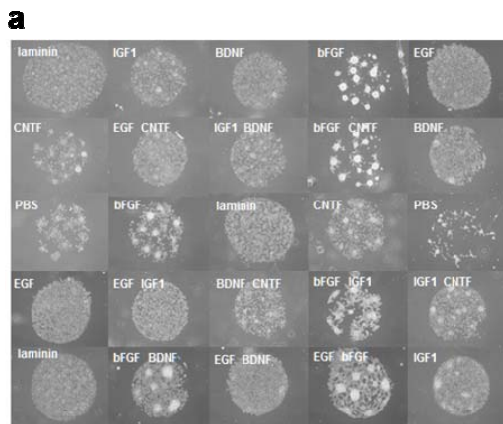


図1. 細胞チップ分析法による神経前駆細胞の増殖因子応答解析。

ー (nestin、class III β -tubulin、GFAP、RIP) を免疫染色することで細胞分化について調べ、BrdUの取り込み量から細胞増殖について調べた(図1a)。これらの実験結果を用いて、クラスター分析を行った(図1b)。その結果、神経幹細胞の分化・増殖に及ぼす細胞増殖因子の影響について基礎的情報を得た。とくに、複数の因子による効果について注目した。

◆モジュール化のためのアダプターの探索

各種のタンパク質性因子をコラーゲンゲル内に固定するため、タンパク質性因子に融合するコラーゲン結合性オリゴペプチドの探索を行った。とくに、コラーゲンに結合することが知られている天然タンパク質に着目し、それらに含まれるコラーゲン結合性アミノ酸配列を取り上げた。なかでも、デコリンに由来する11残基のアミノ酸からなるオリゴペプチド(SYRIADTNIT)をEGFのC末端に融合したキメラタンパク質は、コラーゲンとの親和性を示すと同時に、EGFの構造と機能を維持していることが、円二色性分析やラット神経幹細胞を用いたバイオアッセイによって明らかになった。

◆神経幹/前駆細胞の高度な機能制御が可能な細胞制御因子組込型バイオマテリアルの創製

(1) 移植細胞の生存率を向上させるバイオマテリアル

パーキンソン病の治療を目的として脳内に移植された神経幹/前駆細胞を炎症性細胞から隔離し、また、その細胞に接着シグナルを与えることによって細胞の生存率を高く維持するため、移植細胞をコラーゲンゲル内に分散させ、さらに、ゲル内に組み込んだインテグリン結合性ポリペプチドによって、移植細胞に接着シグナルを与えることを試みた。

インテグリン結合性ポリペプチドの設計には、モジュール化制御因子設計法を適用した。これまでの研究成果をもとに、デコリン由来コラーゲン結合性ペプチドとラミニン α 鎖由来G3ドメインを選択し、それらの二成分からなるキメラタンパク質を合成した。また、同G3ドメインとインテグリンの結合を促進すると言われているラミニン γ 鎖C末端の短鎖ペプチドとをタンデム配置できるような分子設計を行った(図2a)。

合成したインテグリン結合性ポリペプチドの構造ならびにコラーゲン結合性について調べた。さらに、コラーゲン-インテグリン結合性ポリペプチド複合体が神経幹/前駆細胞の生存促進に効果のあることを細胞培養試験および動物脳内移植試験によって示した(図2b)。

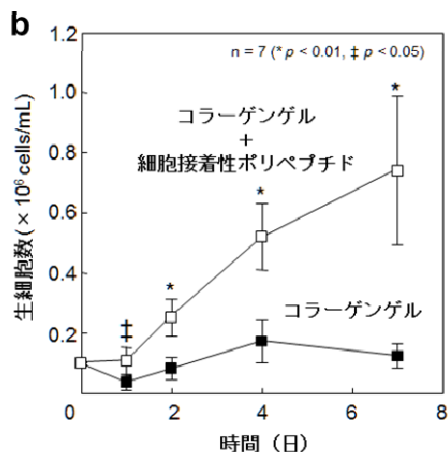
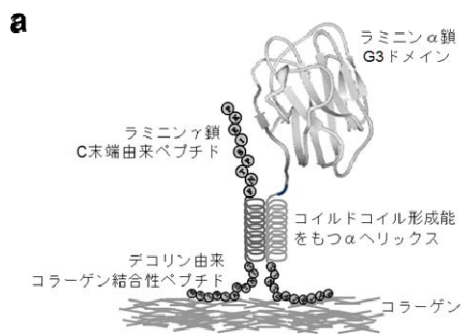


図2. コラーゲンとラミニン由来細胞接着性ポリペプチドとの複合化. a: ラミニン α 鎖 G3 ドメインおよび γ 鎖 C 末端ペプチドからなる複合体の構造. b: コラーゲンゲル内におけるニューロスフェア細胞の生存および増殖.

さらに、とくにコラーゲンゲル/インテグリン結合性ポリペプチド/神経幹前駆細胞複合体の動物脳内移植試験を行い、本移植法が細胞の生存および炎症性ミクログリアの浸潤阻止に有効であることを示した。

現在、本研究成果に関して論文を投稿中である。

(2) ドーパミン産生細胞の分化誘導に効果のあるバイオマテリアル

神経幹細胞からドーパミン産生細胞への誘導に効果のある制御因子として脳由来神経栄養因子 (BDNF) およびグリア細胞株由来 (GDNF) に注目し、それらに基材結合性ポリペプチドを融合したキメラタンパク質を合成し、基材表面に配向固定した。

この表面で神経幹細胞を培養した結果、神経分化およびドーパミン産生細胞の誘導が促進され、これらのモジュール化制御因子が目的通りの効果を発揮することがわかった。また、そのような効率の良い分化誘導が起こる原因について、リガンドの結合に基づく受容体の活性化およびシグナル伝達の観点から考察した。

現在、本研究成果に関して論文を作成中である。

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 4 件)

1. 加藤功一, 遺伝子組換えタンパク質と生体材料, 生体材料, 31(2), 82-89 (2013). 査読無

2. Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Koichi Kato, Hiroo Iwata, Improvement of neural stem cell survival in collagen hydrogels by incorporating laminin-derived cell adhesive polypeptides, Bioconjugate Chemistry, 23(2), 212-221 (2012). 査読有

3. Edgar Y. Egawa, Koichi Kato, Makiko Hiraoka, Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Hiroo Iwata, Enhanced proliferation of neural stem cells in a collagen hydrogel incorporating engineered epidermal growth factor, Biomaterials, 32(21), 4737-4743 (2011). 査読有

4. Shuhei Konagaya, Koichi Kato, Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Yusuke Arima, Hiroo Iwata, Array-based functional screening of growth factors toward optimizing neural stem cell microenvironments, Biomaterials, 32(22), 5015-5022 (2011). 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. Shuhei Konagaya, Koichi Kato, Takashi Komura, Hiroo Iwata, Effect of surface-immobilized extracellular matrices on the proliferation of neural progenitor cells, 3rd TERMIS World Congress 2012, 5-8 September, 2012, Viena, Austria

2. 加藤功一, 再生医療における工学的課題と材料研究の役割, 高分子学会 高分子同友会勉強会, 2012年2月10日, 薬業年金会館(大阪)

3. 加藤功一, 幹細胞制御のためのバイオマテリアル・バイオデバイス設計, 九州大学先端物質化学研究所講演会, 2011年10月27日, 九州大学先端物質化学研究所(福岡)

4. 加藤功一, 再生医療の実現に向けた工学的アプローチ, 日本歯科理工学会 近畿・中四国支部 平成23年度夏季セミナー, 2011年8月28日, 休暇村南淡路(南あわじ)

5. 加藤功一, 幹細胞制御のためのバイオマテリアル・バイオデバイス設計, 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム: ナノ・バイオマテリアルと生化学, 2011 年 9 月 24 日, 京都国際会議場 (京都)

6. 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫, 神経幹前駆細胞からドーパミン産生細胞を効率よく誘導するための基材の設計, 第 60 回高分子年次大会, 2011 年 5 月 25 日, 大阪国際会議場 (大阪)

7. 小村 崇, 加藤功一, 岩田博夫, 人工多能性幹細胞から神経細胞への分化誘導に適した培養基材の設計, 第 60 回高分子年次大会, 2011 年 5 月 25 日, 大阪国際会議場 (大阪)

8. 加藤功一, 梶谷和弘, 中路正, 岩田博夫, 神経幹細胞に発現する機能的ケモカイン受容体のパラレル分析, 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会, 2010 年 11 月 30 日, グランドプリンスホテル広島 (広島)

9. Koichi Kato, Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Hiroo Iwata, Protein engineering approaches for central nervous regeneration, International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, 3 November, 2010, National Health Research Institutes (竹南, 台湾)

[図書] (計 2 件)

1. 加藤功一, CMC 出版, 再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み, 2012, pp 118-124

2. 加藤功一, 日本医学館, バイオマテリアルの基礎, 2012, pp. 199-202

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ドーパミン産生神経の分化誘導用の細胞培養基材

発明者: 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫

権利者: 京都大学, 日本製粉株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2011-118849

出願年月日: 2011 年 5 月 27 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 功一 (KATO KOICHI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 5 0 2 8 3 8 7 5

(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: 3 0 1 6 0 1 2 0

(H22: 研究分担者)

(3) 連携研究者

()

研究者番号: