

研究報告2022 目次 【研究開発部】

有望シーズ展開事業

「超分子ペプチドを用いた脳梗塞の再生医療」プロジェクト

◆ 総括	92
◆ JigSAPによる亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けた齧歯類での実証実験	95
◆ JigSAPによる亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けた形態学的定量解析系の確立	98
◆ 業績	101

「超分子ペプチドを用いた脳梗塞の再生医療」プロジェクト

プロジェクトリーダー 味岡 逸樹

【基本構想】

国内死因の第3位となっている脳血管障害のうち、脳梗塞は全体の75%以上を占め、一命をとりとめた場合でも後遺症が残る場合が多く、我が国の「寝たきり」原因の25%を占めている。脳機能発揮の中心的役割を担う神経細胞（ニューロン）は、皮膚や肝臓の細胞とは異なり増殖能に乏しく、脳組織がほとんど再生しないため、手足の麻痺や言語障害などの後遺症が残ることが多く、患者や家族のQOLを著しく低下させる社会問題となっている。

一方、医師の側にも悩みがある。脳梗塞発症後4.5時間以内であれば血栓溶解治療薬を投与できるが、2%程度の患者にしか治療効果が得られていない。発症8時間以上の患者に対しては安定期まで見守ることしかできず、医師もまた、亜急性期の重度脳梗塞患者に効果のある何らかの治療法を求めているのが現状である。

戦略的研究シーズ育成事業（「脳梗塞治療のためのスキャフォールド材料」）では、生体適合性が高く、脳内投与に適した硬さに分子設計した16アミノ酸からなる両親媒性ペプチド (RADA)₃-RADGを開発した。

本プロジェクトでは、この超分子ペプチドを革新的な医薬品へと開花させるため、低免疫原性の短いアミノ酸からなる両親媒性ペプチドを開発し、「細胞フリー再生治療医薬品」への展開を実現する。なお本プロジェクトは神奈川県が掲げる「ヘルスケア・ニューフロンティア」事業の一角としても研究を進めている。

1. 2021年度の研究目的

プロジェクト1年目となる2021年度は、以下の各項目を重点項目として開発を進めた。

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

細胞外マトリックス (ECM) は生体内で細胞足場としての機能に加えて、吸着した生理活性物質を局所的に放出し、細胞の分化増殖を精密に制御する機能を持つ。損傷した生体組織の再生研究開発において、様々な人工ECMが開発されてきたが、体内安全性の高い両親媒性ペプチドを材料にした超分子ペプチドゲルが注目を浴びている。最もよく知られている (RADA)₄ ペプチド (Ac-RADARADARADARADA-NH₂) は、PuraMatrix®という商品名で研究用の人工ECMとして販売され、PuraStat®という商品名で臨床用の止血剤として販売されている。しかしながら、脳内に投与するには硬すぎるという問題があり、本プロジェクトの非常勤研究員で計算物理学を専門とする北里大・渡辺准教授と有機化学を専門とする農工大・村岡教授との共同研究にて、分子集合体構造を予測する分子動力学 (MD) シミュレーションを新たに確立し、脳内投与に適した硬さに分子設計した16アミノ酸からなる両親媒性ペプチド (RADA)₃-RADG (Ac-RADARADARADARADG-NH₂) を開発した (Ishida et al., Chem Eur J 2019, doi: 10.1002/chem.201902083)。

しかしながら、(RADA)₄ および (RADA)₃-RADG は酸性

条件では流動性の高いゲル状態であるため、酸性状態で生理活性物質と共存させる必要があり、活性状態を保持するという観点から中性で扱えるペプチドの開発が必要とされていた。また、体内投与する際に免疫原性を可能な限り抑えるため、短いアミノ酸配列でゲル化するペプチドの開発が必要であった。

そこで本プロジェクトでは、中性でゲル化し、短いアミノ酸でゲル化するペプチドの開発を目的とした。

(2) JigSAP ゲルからの修飾タンパク質徐放効果の検討

前述したように、人工ECMには細胞足場としての機能の他に、生理活性物質を局所的に徐放する機能が重要である。しかしながら、生理活性物質の吸着と放出はトレードオフの関係にあり、実際、予備実験の結果から、(RADA)₄あるいは(RADA)₃-RADG配列を付加した生理活性タンパク質を(RADA)₄あるいは(RADA)₃-RADGに取り込ませたところ、ペプチド配列付加によりゲルへの取り込みが顕著に増加したものの、ほとんどゲルから放出されないという知見を得た。この理由として、(RADA)₄あるいは(RADA)₃-RADGペプチドでは、アラニン側鎖からなる疎水面が平面形状であるため、疎水性相互作用が強固になり、一度取り込んだペプチドタグ付きタンパク質を放出しにくいことが考えられた。そこで、新規ペプチド開発では両親媒性ペプチドの疎水面に、吸着と放出の起こりやすい分子設計を

行い、新規ペプチドタグを付加したタンパク質の取り込みと徐放を達成する新規ペプチドの開発を目的とした。

(3) 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を使ったマウス脳梗塞モデルの治療効果検討とその作用機序解析

齧歯類脳梗塞モデルにおいて、VEGF を亜急性期に脳内連続投与すると運動機能障害が回復すると報告されている (Zhang et al., J Clin Invest 2000, <https://doi.org/10.1172/JCI19369>)。そこで本プロジェクトでは、新規ペプチドタグを付加した VEGF を超分子ペプチドゲルから徐放させ、単回投与で治療効果を発揮させることを目的とした。

(4) 形態学的な再生を定量的に評価する実験系の開発

非臨床 POC 取得には、脳梗塞後の再生メカニズム解明が必要不可欠であり、特に形態学的な解析が鍵となるため、2021 年度には超高解像度顕微鏡と三次元画像解析ソフトウェアを研究室に設置し、定量解析の実験系確立を行った。

2. 2021 年度の研究成果

(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

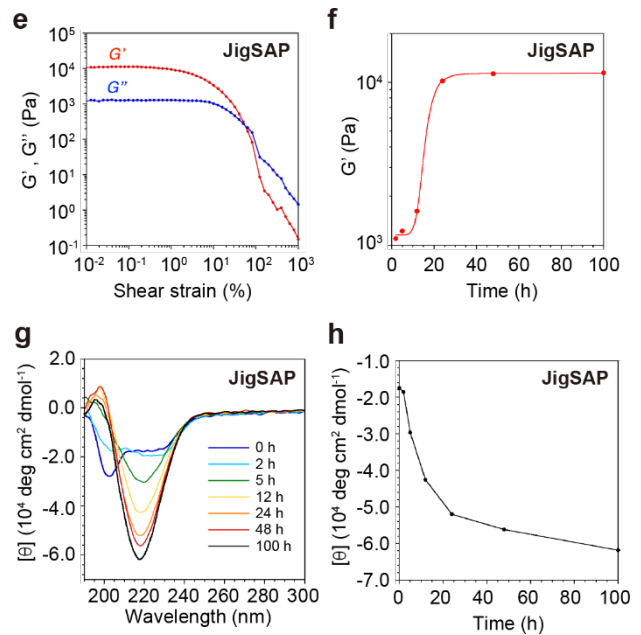
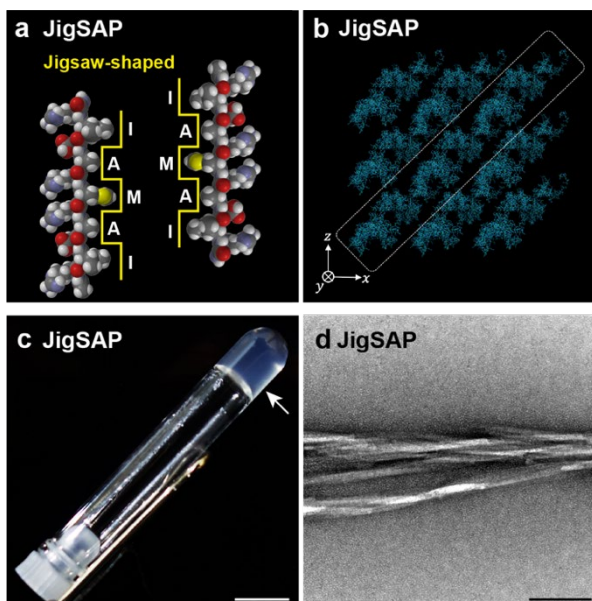


図 1 : JigSAP によるハイドロゲル形成

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)。

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)。

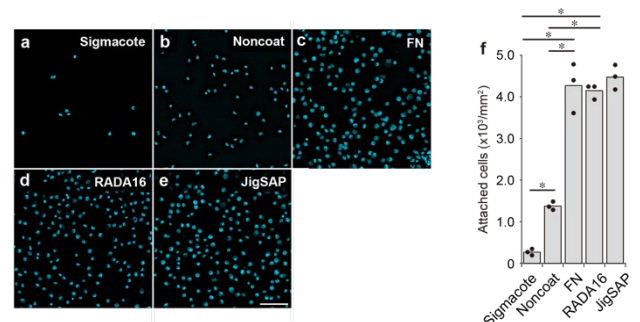


図 2 : JigSAP ペプチドの細胞接着性

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

凹凸形状の疎水性表面が超分子特性へ与える影響を調べるために、疎水性表面が平面の両親媒性ペプチドである 5V (Ac-RVDVRVRVDVR-NH₂) を合成した (図 3a)。5V は

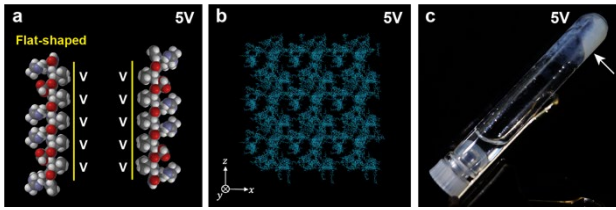


図3：平面形状の疎水性表面を持つ5Vペプチドの特性
 a, 5VペプチドのFSAPとしての特性. Ac-RVDVRVDVR-NH₂ (5V)の空間充填モデル. b, MDシミュレーションで得られた、5Vの超分子構造スナップショット. c, 5Vの写真.

は準研究員・秋本の研究報告欄に記載した。

MDシミュレーションにより、非一方向性のメッシュ状構造を形成することが予測され(図3b)。実際、5Vは溶液中で懸濁液のままであり、ゲル化しなかった(図3c)。

以上の結果より、独自に開発したJigSAPは、11アミノ酸という短いペプチドでありながらも、中性でゲル化し、脳内投与に適した動的特性を示し、人工ECMとしての重要な細胞接着性も有することが明らかとなった。

(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。なお、この詳細は研究員・原の研究報告欄に記載した。

(3) 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を使ったマウス脳梗塞モデルの治療効果検討とその作用機序解析

JigSAP配列を付加したVEGFも、EGFPと同様に約1週間かけて徐放することを確認し、戦略的研究シーズ育成事業で確立した、マウス中大脳動脈遠位部梗塞(dMCAO)モデルと光化学反応誘発性血栓形成(PT)モデルの2種類の脳梗塞モデルマウスを用いて、VEGF-JigSAPの治療効果を検討し、脳梗塞発症1週間後の脳内単回投与で歩行機能改善を認めた。また、血管内皮細胞の増殖促進と数の増加、および、ニューロン数減少の抑制を認め、VEGF-JigSAPによる亜急性期脳梗塞モデルの治療効果は血管新生とニューロン細胞死抑制効果の影響によるものと示唆された。この詳細は研究員・原と準研究員・秋本の研究報告欄に記載した。

(4) 形態学的な再生を定量的に評価する実験系の開発

非臨床POC取得には、損傷脳の再生メカニズム解明が必要不可欠である。特に形態学的な解析が鍵となるため、超高解像度顕微鏡と三次元画像解析ソフトウェアを駆使し、定量解析の実験系確立を行い、血管体積と血管分岐を定量化に成功した。また、損傷領域近傍でのミクログリアによる貪食活性を評価できる観察系を確立した。この詳細

JigSAP による亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けた 齧歯類での実証実験

「超分子ペプチドを用いた脳梗塞の再生医療」プロジェクト
原 央子

1. はじめに

人工細胞外マトリックス (ECM) には細胞足場としての機能の他に、生理活性物質を局所的に放出する機能が重要である。11 アミノ酸からなる JigSAP (Jigsaw-shaped self-assembling peptide) (Ac-RIDARMRADIR-NH₂) は、凹凸形状を持つ組木状の疎水面を有しており、JigSAP 配列を付加したタンパク質と混合してゲル化することで、タグ付きタンパク質を効率的に取り込み、数日かけて徐放することを狙って開発した両親媒性ペプチドである。そこで 2021 年度は、タンパク質の吸着と徐放を評価し、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を使った亜急性期脳梗塞治療の実現に向けた齧歯類での実証実験を行った。

2. 実験と結果

(1) JigSAP ゲルからの修飾タンパク質の徐放効果検討

C 末端側に、疎水性表面が凹凸形状を持つ JigSAP および疎水性表面が従来の平面形状を持つペプチド 5V (Ac-RVDVRVRVDVR-NH₂) 及び RADA16 (Ac-RADARADARADARADA-NH₂) を付加した EGFP-JigSAP、EGFP-5V、EGFP-RADA16 のペプチドゲルへの取り込みを検討した (図 1a)。ペプチドタグ付き EGFP を対応する両親媒性ペプチドと混合し、ペプチドタグ付き EGFP のペプチドゲルへの取り込み効率を、ELISA 法によって評価した (図 1b-d)。JigSAP 付加 EGFP タンパク質とタグなし EGFP タンパク質の間では、取り込み効率に顕著な差を認めた (図 1b)。同様に、5V と RADA16 付加 EGFP タンパク質も、タグなし EGFP よりも対応するペプチドゲルへの高い取り込み効率を示した (図 1c,d)。これらの結果より、タンパク質の取り込みにペプチドタグが重要な役割を果たすことが示唆された。

放出に関しては、JigSAP ペプチドゲルは、従来の疎水性表面が平面形状のペプチドゲルよりも、タグ付きタンパク質の長期放出能を発揮することが生体外実験により明らかとなった (図 1e)。

次に、生体内において JigSAP タグ付きタンパク質が *in vivo* 注入部位から放出されるかどうかを調べるために、EGFP-JigSAP と EGFP-RADA16 をそれぞれ混合した JigSAP と RADA16 ペプチドを非損傷マウス脳内に投与し

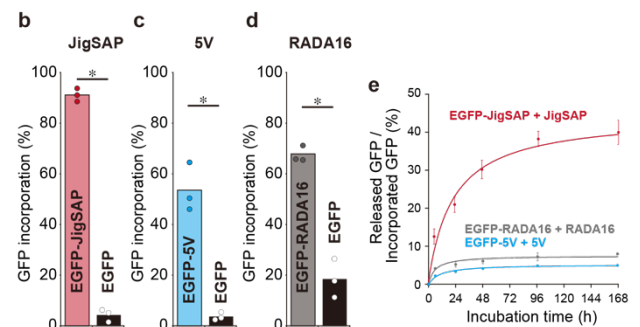
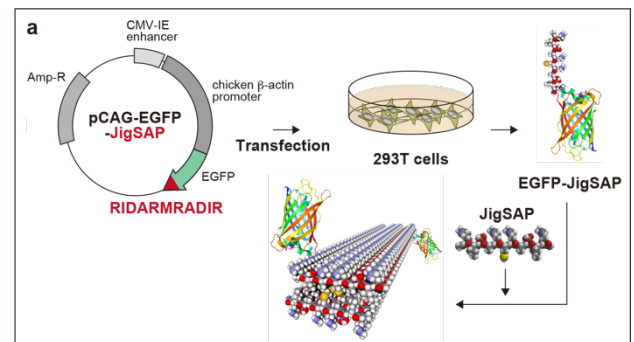


図 1 : JigSAP タグ付き EGFP タンパク質の効率的な組み込みと徐放化

a, 実験デザイン : JigSAP ペプチドをコードする配列を EGFP cDNA の C-末端に付加した。EGFP-JigSAP を発現するプラスミドを 293T 細胞に遺伝子導入し、粗精製した EGFP-JigSAP タンパク質を過剰量の JigSAP と混合した。b-d, ペプチドタグ付き GFP と非タグ付き GFP の取り込み比率を示す。EGFP-JigSAP (b, 赤色), EGFP-5V (c, 青色), EGFP-RADA16 (d, 灰色) はそれぞれ JigSAP, 5V, RADA16 ペプチドと混合してゲル化した。タグなし EGFP (b-d, 黒色) をコントロールとして用いた。e, GFP の放出量と取り込まれた GFP との比率。EGFP-JigSAP (赤色), EGFP-5V (青色), EGFP-RADA16 (灰色) は、それぞれ JigSAP, 5V, RADA16 ゲルからの放出である。

た (図 2)。投与 3 時間後で、EGFP-JigSAP および EGFP-RADA16 注入脳の両方で、投与した部位に EGFP 蛍光シグナルが明確に検出された (図 2 a, b)。一方、投与 72 時間後では、EGFP-RADA16 投与脳でのみ明確な EGFP シグナルが検出され、EGFP-JigSAP の注入部位からの放出が示唆された。

投与した JigSAP ペプチドの免疫原性を検討するために、JigSAP と RADA16 投与 7 日目後にニューロンマーカー NeuN、活性化アストロサイトマーカー GFAP、ミクログリ

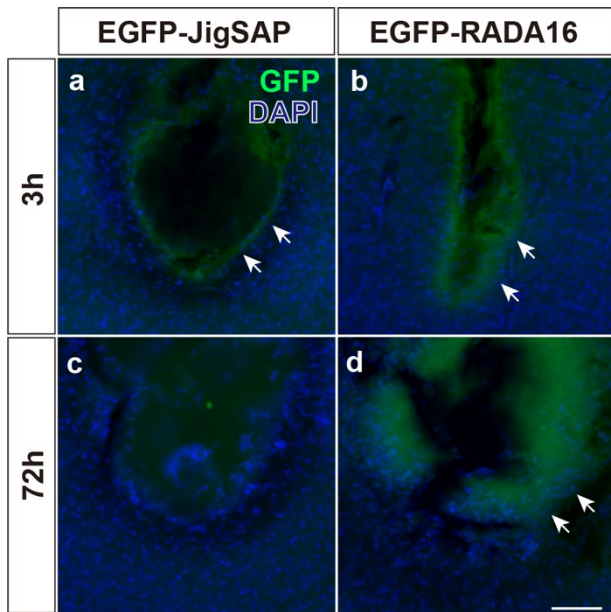


図 2 : EGFP-JigSAP および EGFP-RADA16 の脳への注入 a-d、注入後 3 時間 (a, b) および 24 時間 (c, d) の脳の EGFP 蛍光画像 (緑色) および DAPI (青色) 画像。(a, b, d) の矢印は EGFP シグナルを示す。

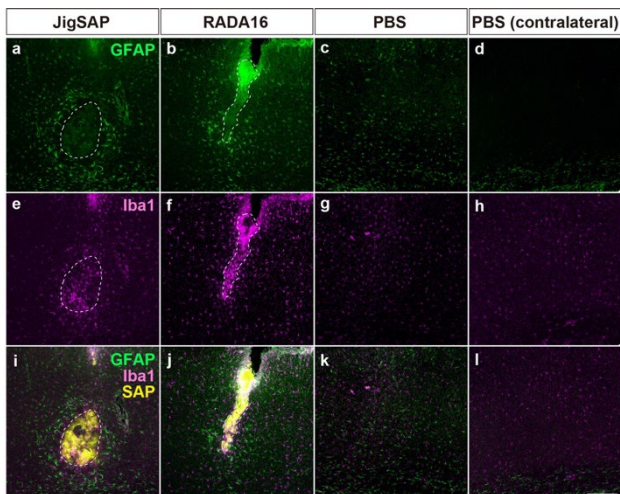


図 3 : JigSAP と RADA16 の脳内注入後の異物反応評価 4-ペンチノイル基を有する JigSAP と RADA16 (Alkyne-JigSAP と Alkyne-RADA16) を用いて、in vivo でのペプチドゲルを可視化した。活性化アストロサイトマーカー GFAP (緑色) (a-d)、ミクログリアマーカー Iba1 (マゼンタ色) (e-h)、ペプチドゲル (黄色) (i-l)。

アマーカー Iba1 で免疫染色した (図 3)。JigSAP 投与部位において Iba1、GFAP 陽性細胞が検出されたが、異物反応レベルは軽度であり、ヒトで既に臨床応用されている RADA16 投与部位と同程度であった。以上の結果から、JigSAP 付加タンパク質を JigSAP と混合投与することで、重大な異物反応を引き起こすことなく、生体内徐放の達成に成功した。

(2) 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を使ったマウス脳梗塞モデルの治療効果検討

このような JigSAP システムの動的特性を踏まえ、血管

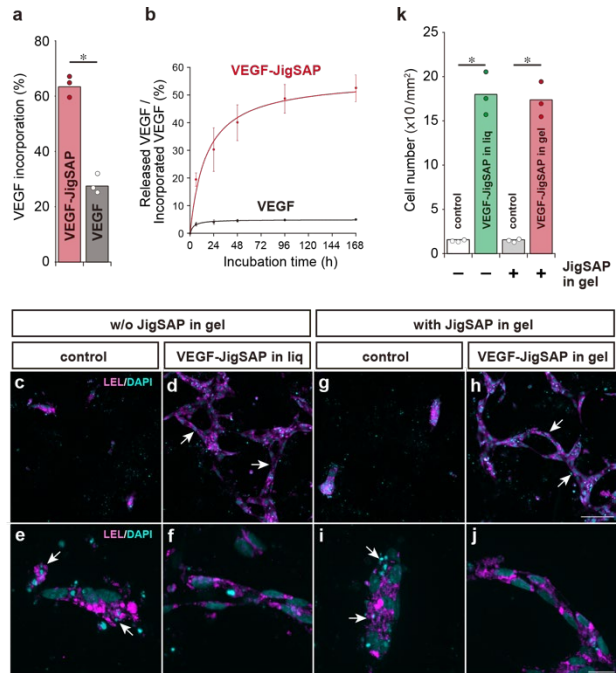


図 4 : JigSAP タグ付き VEGF タンパク質の持続的な放出と in vitro 血管新生

a, ペプチドゲルへの VEGF の取り込み比率。VEGF-JigSAP (赤色) とタグなし VEGF (黒色)。b, VEGF の放出量と取り込まれた VEGF の比率。c-j, 血管内皮細胞マーカー Lycopodium esculentum lectin (LEL) (マゼンタ色) および DAPI (青色) による HUVEC。(d) および (h) の矢印は、管腔様構造を示す。(e) と (i) の矢印は、死細胞の特徴である核の凝縮を示す。k, HUVEC の細胞数測定。

内皮細胞増殖因子 (VEGF) タンパク質を用いたマウス脳梗塞モデルの治療効果検討を行った。EGFP-JigSAP のデータから予想された通り、JigSAP 付加 VEGF タンパク質 (VEGF-JigSAP) は、タグなし VEGF よりも効率的に JigSAP ペプチドゲルに取り込まれ (図 4a)、さらに、VEGF-JigSAP は、EGFP-JigSAP 同様の長期放出が認められた (図 4b)。VEGF-JigSAP を取り込んだ JigSAP ペプチドゲルが in vitro 血管新生を促進するかどうかを調べるために、コラーゲンゲル中でヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の管腔様形成アッセイを実施し、ゲル内に取り込まれた VEGF-JigSAP が溶液に添加したリコンビナント VEGF と同程度の活性が認められ、VEGF-JigSAP が VEGF 同様の生物活性を持つことが示された (図 4 c-k)。

そこで、マウス中大脳動脈遠位部梗塞 (dMCAO) モデルと光化学反応誘発性血栓形成 (PT) モデルの 2 種類の脳梗塞モデルマウスを用いて、VEGF-JigSAP の治療効果を検討した。図 5 に示すように、dMCAO 作製 7 日後の歩行機能解析テスト (FFT) を行った直後にペプチドゲルを脳内に単回投与し、投与 7 日後に FFT を行った。その結果、JigSAP ゲル単独、VEGF-JigSAP 単独、タグなし VEGF + JigSAP 混合投与群では歩行機能改善効果が認められなかったが、VEGF-JigSAP + JigSAP の単回投与群では顕著な歩行機能改善効果が認められた (図 5 a)。さらに、VEGF-JigSAP と VEGF-RADA16 の効果を比較するために、VEGF-JigSAP と VEGF-RADA16 を取り込ませた JigSAP と

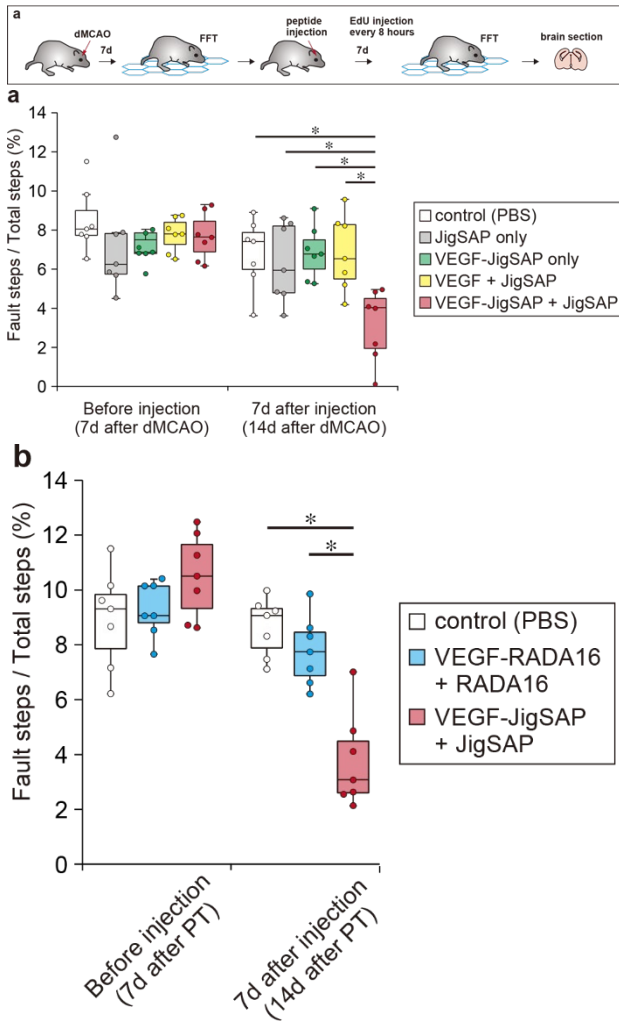


図5: VEGF-JigSAPを組み込んだJigSAPペプチドゲルの単回注入による脳梗塞モデルマウスの機能回復。

a, dMCAOモデル b, 光血栓 PTモデル。*P<0.05 n=7.

RADA16ペプチドゲルをそれぞれ注入した。この実験では、VEGF-JigSAP+JigSAPがdMCAOモデルでのみ機能回復を促進した可能性を排除するために、PTモデルを使用した。VEGF-JigSAP+JigSAPはPTモデルでの行動回復も改善したが、VEGF-RADA16+RADA16は改善しなかった(図5b)。これらの結果より、脳梗塞発症1週間後のVEGF-JigSAP+JigSAPの脳内単回投与が、亜急性期マウス脳梗塞モデルの治療効果を持つことが判明した。

3. 今後の展望

亜急性期脳梗塞の治療効果を持つVEGFには血管透過能もあることから、未だ臨床応用されていない。また、化学合成では製造できない分子量の大きいタンパク質のため、臨床応用に向けて莫大な製造費用を要するという問題点もある。今後は臨床応用に適した化学合成可能な生理活性物質を用いて、開発研究を進めていく。

JigSAP による亜急性期重度脳梗塞治療の実現に向けた 形態学的定量解析系の確立

「超分子ペプチドを用いた脳梗塞の再生医療」プロジェクト
秋本 沙織

1. はじめに

JigSAP の医薬品展開に必要な不可欠となる非臨床 POC 取得には、脳梗塞後の再生メカニズム解明が必要不可欠であり、特に形態学的な解析が鍵となる。有望シーズ展開事業の初年度となる 2021 年度は、超高解像度顕微鏡と三次元画像解析ソフトウェアを研究室に設置し、定量解析の実験系確立を行った。

2. 実験と結果

(1) 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を使った脳梗塞治療効果の作用機序解析

マウス脳梗塞モデルとして、本研究では中大脳動脈遠位部梗塞 (dMCAO) モデルを用いた。dMCAO 作製 1 週間後に VEGF-JigSAP+JigSAP を脳内単回投与し、さらに 1 週間後に脳組織切片を作製して、組織学的解析を行った。損傷中心部や損傷周囲のペナンプラ領域の体積には影響を与えず、また、Iba1 陽性領域で測定される病変サイズの減少も認められなかった (図 1)。

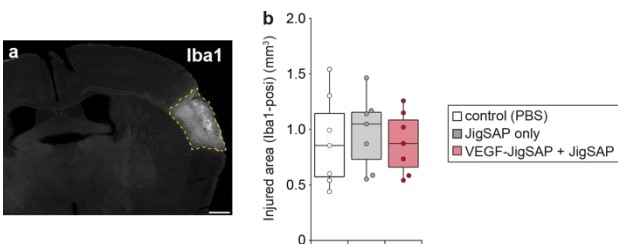


図 1: ペプチド注入後の病変領域評価。
a, 対照群 (PBS 投与) 損傷部位の Iba1 染色画像. b, Iba1 強陽性部位の体積測定

そこで、血管内皮細胞のマーカーラミニンの免疫組織染色を行ったところ、VEGF-JigSAP+JigSAP の脳内単回投与により、ペナンプラにおけるラミニン陽性細胞の数が増加した (図 2 b-f, v)。また、チミジンアナログの EdU を 8 時間おきに 7 日間腹腔内注射して増殖細胞を標識し、増殖血管内皮細胞の数を調べた。VEGF-JigSAP+JigSAP の投与で、EdU/ラミニン共陽性細胞数が有意に増加し (図 2 g-u, w)、ペナンプラでの血管新生促進が示唆された。次に、神経保護効果を評価するために、変性したニューロンを標識する Fluoro-Jade C (FJC) 染色とニューロンマーカー NeuN の抗体染色を行った。VEGF-JigSAP+JigSAP の投与によ

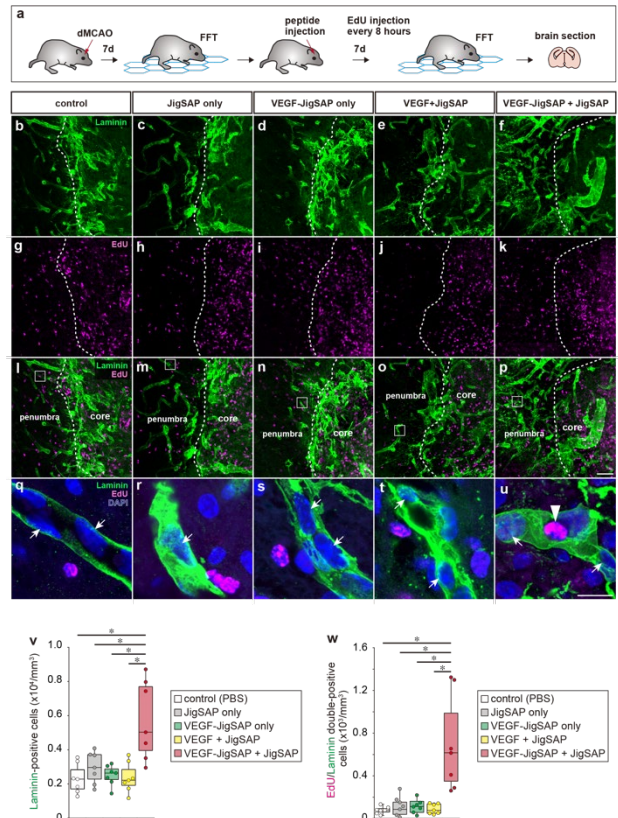


図 2: VEGF-JigSAP タンパク質を組み込んだ JigSAP ナノファイバーの単回注入による脳梗塞モデルマウスの血管新生。
a, 実験デザイン. dMCAO 後 7 日目に、ペプチドゲルを脳内に単回投与し、EdU を 8 時間置き 1 週間投与して増殖細胞をラベルした. b-f, ラミニン (緑色)、g-k, EdU (マゼンタ色)、l-p, 損傷中心部とペナンプラの境界におけるラミニン (緑色) と EdU (マゼンタ色) 染色画像. q-u, ペナンプラでのラミニン (緑色)、EdU (マゼンタ色)、DAPI (青色) の高倍率画像. v, w, ペナンプラでのラミニン陽性 (v) および EdU/ラミニン共陽性 (w) 細胞の細胞数測定.

り、ペナンプラでの NeuN 陽性細胞数が増加し (図 3 a-j)、FJC 陽性細胞数が著的に減少した (図 3 k-t) ことから、ペナンプラでの神経細胞死を抑制していることが示唆された。過去の報告において、VEGF が脳損傷後の成体ニューロン新生を促進することが知られている。我々は、EdU/NeuN 共陽性細胞の数を調べることで、成体ニューロン新生への影響を評価したが、共陽性細胞は観察されな

った。したがって、VEGF-JigSAP + JigSAP の脳内単回投与は、成体ニューロン新生を促進することなく、血管新生と神経保護を促進することが示唆された。

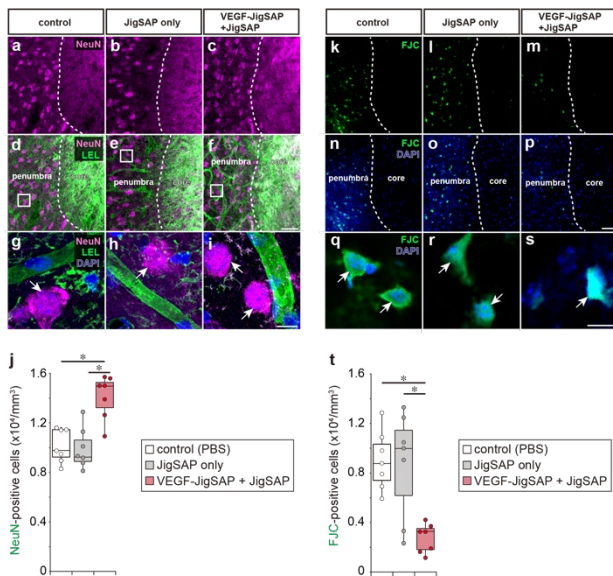
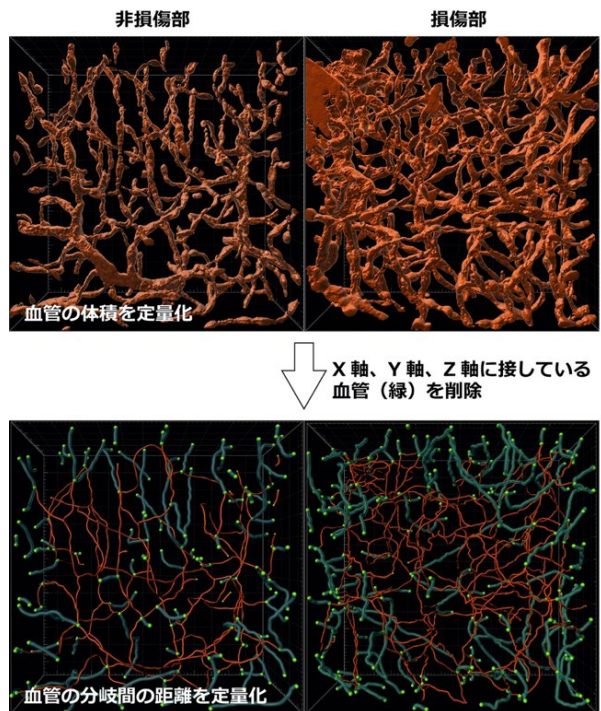


図3： VEGF-JigSAP を組み込んだ JigSAP ペプチドゲルの単回注入による脳梗塞モデルマウスの神経保護作用。
a-f、損傷中心部とペナンプラの境界における NeuN (マゼンタ色) (a-c) および NeuN (マゼンタ色) /LEL (緑色) (d-f) 染色画像。g-i、ペナンプラにおける NeuN (マゼンタ色)、LEL (緑色) および DAPI (青色) の高倍率画像。j、ペナンプラにおける NeuN 陽性細胞の細胞数測定
k-p、損傷中心部とペナンプラの境界における FJC (緑色) (k-m) および FJC (緑色) /DAPI (青色) (n-p) 画像、q-s、ペナンプラにおける FJC (緑色) /DAPI (青色) の高倍率画像。t、ペナンプラにおける FJC 陽性細胞の細胞数測定。

(2) 形態学的な再生を定量的に評価する実験系の開発

非臨床 POC 取得には、損傷脳の再生メカニズム解明が必要不可欠である。特に形態学的な解析が鍵となるため、2021 年度上半期には超高解像度顕微鏡と三次元画像解析ソフトウェアを研究室に設置し、定量解析の実験系確立を行った。図4は、ペナンプラと反対側の非損傷部位の血管体積と血管分岐を定量化し、観察系を確立したことを示す図である。具体的には、生体組織と屈折率が近いシリコンオイルとシリコンオイル対応 25 倍対物レンズを用いて、200 μ m x 200 μ m x 100 μ m の血管画像を顕微鏡で取得し、三次元画像解析ソフトウェアにて血管表面をオブジェクト化した。なお、血管画像の取得には、タモキシフェン投与により血管内皮細胞で赤色蛍光タンパク質が発現する遺伝子改変マウスを利用し、血管の体積の定量化は血管表面のオブジェクト画像 (図4の上の画像) を用いた。その解析の結果、損傷部は非損傷部に比べて顕著に血管が発達していることが定量的に示された (図4表)。一方、血管分岐の程度を定量化するために、血管分岐間の平均距離を定量化するプロトコルを作製した (図4の下の画像で緑色で示されている血管)。このプロトコルにより、血管までの距離を正確に測定することができ、実際、損傷部の方が血管分岐までの距離が短く、損傷後に新たな血管分岐が生じ



	損傷部	非損傷部	
血管の体積	697,283	278,253	um ³
血管分岐間の平均距離	39.18	32.41	um

図4： 血管体積の定量化と血管分岐間の平均距離測定

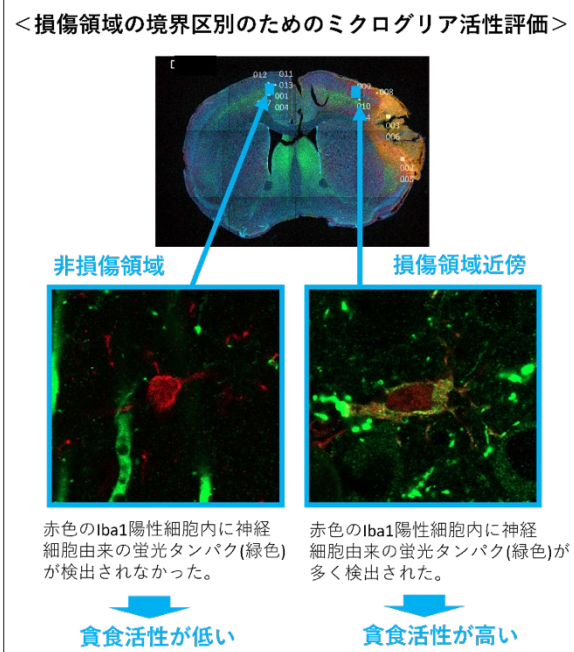


図5： ミクログリア活性評価

た可能性が示された (図4表)。

さらに、損傷領域と非損傷領域の識別を試みた。形態学的な解析による損傷再生メカニズム解明において、損傷領域と非損傷領域の区別の指標が有用だが、ペナンプラと呼ばれる損傷領域周辺部は、その知見が重要な意味を持つにも関わらず、境界が不明瞭であることから厳密に調査する

ことが難しい。我々の脳梗塞モデルマウスにおいても、脳組織染色により損傷領域を特定できるが、損傷中心部や損傷周辺部であるペナンプラ、非損傷領域の境界を明確にすることは難しいため、指標を作り一定の条件で領域を区別してより明瞭な形態学的解析データを得たい。

一方で、損傷が強い領域においてミクログリアが活発に活動し、損傷による細胞死などから発生した老廃物を貪食することは、これまでの多くの研究で明らかにされてきた。ミクログリアの形態や貪食程度により損傷領域の境界の指標を設定できれば、本研究で行う損傷脳再生メカニズムの解明の形態学的な定量解析で、より明瞭な結果を得られると期待できる。

損傷部と反対側の非損傷部位のミクログリアの貪食程度を可視化したところ、貪食程度の比較に成功した。具体的には、脳梗塞モデルマウスの Iba1 陽性細胞内にニューロン由来の老廃物が蓄積しているかを可視化した。恒常的にニューロンで蛍光タンパク質 YFP を発現するトランスジェニックマウスで脳梗塞モデルを作製し、損傷領域を含む組織をミクログリアのマーカーである抗 Iba1 抗体染色を行った。

共焦点蛍光顕微鏡で XYZ の撮影をして得られた Iba1 陽性のミクログリアの細胞質内に蓄積された神経細胞由来の蛍光タンパク質 YFP の有無を xyz の 3 次元画像解析により検証し、損傷領域近傍の Iba1 陽性細胞内に多数の YFP シグナルを検出し、非損傷領域では Iba1 陽性細胞内の YFP シグナルはほとんど得られなかった (図 5)。この観察方法により、まず損傷領域近傍でミクログリアによる貪食活性を評価できる観察系を確立した。

3. 今後の展望

本研究で確立した形態学的な再生を定量的に評価できる実験系は、多検体サンプルの解析を可能にする。本研究で明らかとなった亜急性期脳梗塞の治療効果を持つ VEGF には血管透過能もあることから、未だ臨床応用されていない。また、化学合成では製造できない分子量の大きいタンパク質のため、臨床応用に向けて莫大な製造費用を要するという問題点がある。今後は臨床応用に適した化学合成可能な生理活性物質を用いて開発研究を進めていくが、本研究で確立した形態学的再生の定量評価で研究開発の加速化を図る。

業 績

【原著論文】

1. Atsuya Yaguchi, Mio Oshikawa, Go Watanabe, Hirotsugu Hiramatsu, Noriyuki Uchida, Chikako Hara, Naoko Kaneko, Kazunobu Sawamoto, Takahiro Muraoka, and Itsuki Ajioka
Efficient protein incorporation and release by a jigsaw-shaped self-assembling peptide hydrogel for injured brain regeneration.
Nature Commun. **12**, 6623 (2021)
2. Jindan Sheng, Susumu Kohno, Nobuhiro Okada, Nobuyuki Okahashi, Kana Teranishi, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, Paing Linn, Naoko Nagatani, Minako Yamamura, Kenichi Harada, Shin-ichi Horike, Hiroshi Inoue, Seiji Yano, Sharad Kumar, Shunsuke Kitajima, Itsuki Ajioka, and Chiaki Takahashi
Treatment of Retinoblastoma 1-Intact Hepatocellular Carcinoma With Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Combination Therapy.
Hepatology **74**, 4, 1971-1993 (2021)
3. Chiharu Ueda, Junsu Park, Kazuya Hirose, Subaru Konishi, Yuka Ikemoto, Motofumi Osaki, Hiroyasu Yamaguchi, Akira Harada, Masaru Tanaka, Go Watanabe, Yoshinori Takashima,
Behavior of Supramolecular Cross-Links Formed by Host-Guest Interactions in Hydrogels Responding to Water Contents.
Supramolecular Materials **1** 100001 (2021)
4. Atsuya Yaguchi, Hirotsugu Hiramatsu, Atsuya Ishida, Mio Oshikawa, Itsuki Ajioka, Takahiro Muraoka,
Hydrogel-Stiffening and Non-Cell Adhesive Properties of Amphiphilic Peptides with Central Alkylene Chains.
Chem Eur J **27**, 36, 9295-9301 (2021)
5. 野尻涼矢、村岡貴博
凝集抑制効果を併せ持った酸化的タンパク質フォールディング促進剤の開発
日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
6. 松本陽佑、松崎元紀、稲葉謙次、奥村正樹、村岡貴博
芳香族化合物による酸化的タンパク質フォールディング促進効果
日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
7. 西野隼人、三宅亮介、村岡貴博
酸化的タンパク質フォールディングを操作するポリカチオン化合物の開発
日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
8. 矢口敦也、平松弘嗣、味岡逸樹、村岡貴博
高次構造転移特性を有するヒドロゲル化ペプチドの開発と組織再生への応用
日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
9. 岡田隼輔、奥村正樹、村岡貴博
生体酵素模倣を指向したタンパク質酸化的フォールディング促進剤の開発
日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
10. 内田紀之、村岡貴博
リン脂質膜変形分子素子の開発 (1) : 光応答性両親媒性分子を用いたエンドサイトーシス様ベシクル分裂
日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
11. Go Watanabe, Mitsuo Hara, Jun Yoshida,
Visualizing helical stacking of propeller-shaped metallomesogen molecules: a molecular dynamics study.
Pacificchem 2021、2021 年 12 月, オンライン
12. Atsuya Yaguchi, Hirotsugu Hiramatsu, Mio Oshikawa, Itsuki Ajioka, Takahiro Muraoka
Development of synthetic amphiphilic peptides with bio-functions and stimuli-responses
Pacificchem 2021, 2021 年 12 月, オンライン

【口頭発表】

1. 露木 弘美、上田 智也、西村 慎之介、塩本 昌平、村上 大樹、田中 賢、渡辺 豪、
分子動力学シミュレーションを用いた生体親和性ポリマーブラシのマイクロダイナミクス解明
日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
2. 石井 佐和、西村 達也、前田 勝浩、渡辺 豪
分子動力学シミュレーションによる外部刺激応答性らせん高分子の構造解明
日本化学会 第 102 春季年会, 2022 年 3 月, オンライン
3. 河北杏樹、内田紀之、村岡貴博
リン脂質膜変形分子素子の開発 (2) : チューブ状リン

13. Itsuki Ajioka
Artificial Scaffolds Mimicking The Extracellular Environment of Developing Brain
the 16th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry (APSN), 2021 年 12 月, オンライン
14. 味岡 逸樹、村岡 貴博、渡辺 豪
粘弾性を調節した超分子ペプチドゲルの開発と脳梗塞の再生治療
第 44 回日本分子生物学会年会, 2021 年 12 月, 横浜・オンライン
15. 味岡 逸樹、矢口 敦也、押川 未央、渡辺 豪、村岡 貴博
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
第 43 回日本バイオマテリアル学会大会, 2021 年 11 月, 名古屋・オンライン
16. 渡辺 豪、關 拓和、石井 宏幸、竹谷 純一、岡本 敏宏
革新的有機半導体分子創製を目指した計算科学的手法の確立
2021 年分子シミュレーション討論会, 2021 年 11 月, 岡山
17. 矢口敦也、平松弘嗣、味岡逸樹、村岡貴博
高次構造転移し超分子ゲルを形成する新規自己集合性ペプチドの開発と応用
第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021, 2021 年 10 月, オンライン
18. 付若瀛、内田紀之、村岡貴博
二次構造転移を伴う自己集合性ペプチドの開発とゲル形成特性
第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021, 2021 年 10 月, オンライン
19. 渡辺 豪
シミュレーションで水圏機能材料における分子の動きを“視る”
第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021, 2021 年 10 月, オンライン
20. 關 拓和、渡辺 豪、竹谷 純一、岡本 敏宏
有機半導体分子が示す結晶多形を再現する分子動力学計算手法の確立
第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021, 2021 年 10 月, オンライン
21. 味岡 逸樹、村岡 貴博、渡辺 豪
超分子ペプチドの設計と脳梗塞の再生治療
22. Go Watanabe, Mitsuo Hara, Jun Yoshida
A Molecular Dynamics Study of Helical Columnar Liquid Crystals Based on Propeller-Shaped Metallomesogens
Optics of Liquid Crystals 2021, 2021 年 9 月, 沖縄
23. 渡辺 豪、栄村 弘希、アボット ニコラス、加藤 隆史
生体分子認識部位を持つ両親媒性メソゲンの水面上単分子膜におけるタンパク質吸着の分子動力学シミュレーション
2021 年日本液晶学会討論会, 2021 年 9 月, オンライン
24. 矢口 敦也、平松 弘嗣、味岡 逸樹、村岡 貴博
アルキレン鎖導入ペプチドの超分子ファイバー形態と機能
日本化学会 生体機能関連化学部会 若手の会 第 32 回サマースクール, 2021 年 7 月, オンライン
25. 矢口 敦也、石田 敦也、押川 未央、味岡 逸樹、平松 弘嗣、村岡 貴博
自己集合性ペプチド中央へのアルキレン鎖導入効果
2021 年繊維学会年次大会, 2021 年 6 月, オンライン

【特許】

- (1) 国内特許出願 2 件
- (2) 国外特許出願 1 件