

研 究 報 告 書

「低酸素状態で構造変換するタンパク質を用いる脳再生デバイスの創製」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研 究 者: 味岡 逸樹

1. 研究のねらい

脳は一度損傷を受けると再生修復しない組織だと考えられている。例えば、脳梗塞は、脳の血管が詰まり、酸素や血液の供給が遮断され、脳のニューロンが脱落する疾患である。脱落したニューロンが手足の運動を制御するニューロンであれば、手足の麻痺が起こり、自然治癒力ではほとんど回復しない。したがって、従来の治療法開発は、血管梗塞からニューロンの脱落までの急性期における血流再開や脱落ニューロンの保護を目的としたものであった。しかしながら、多くの脳梗塞患者の治療法開発として喫緊の課題となっているのは、従来の治療法では回復しない急性期の段階を過ぎた亜急性期の治療法開発である。本研究では、従来のアプローチとは全く異なり、亜急性期において脳ニューロンの補充及び生着を可能にする 2 つの技術開発に挑んだ。

1 つめの技術開発は、増殖しないと考えられている脳ニューロンを細胞分裂させる技術開発である。近年の神経生物学研究の発展により、哺乳類の脳にも潜在的な再生能力があることが明らかになってきた。例えば、我々の研究によって、ニューロンにも潜在的な増殖能があることが明らかになった (Ajioka et al., Cell 2007; Oshikawa et al., Development 2013)。本研究では、ニューロンの潜在的増殖能力を発揮させることを 1 つめのねらいとした。

2 つめの技術開発は、補充した脳ニューロンに酸素や栄養分を供給し、生着に必要な不可欠な血管を再構築させる技術開発である。我々はこれまでに、ニューロンの足場として機能するタンパク質を材料にし、ニューロンの三次元培養や生体内での足場となるスポンジ形状の人工足場を開発してきた (Ajioka et al., Biomaterials 2011; Ajioka et al., Tissue Eng Part A 2015)。本研究では、血管誘引機能を付加したスポンジ型人工足場を作製することで、脳梗塞領域に血管を再構築させることを 2 つめのねらいとした。

本研究により、脳梗塞などの損傷で失われた神経機能を回復させるために必要な基盤要素技術が確立され、亜急性期における脳梗塞再生医療の実現化の第一歩となる技術開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、脳梗塞モデルマウスの損傷領域においてニューロンを補充し、血管を再構築させることを目的とし、2つの研究テーマを掲げた。1つめの研究テーマAとして、ニューロンの補充を目的とした「脳梗塞領域でニューロンを細胞分裂させる技術開発」、2つめの研究テーマBとして、血管再生を目的とした「脳梗塞領域で血管を再構築させる技術開発」を設定した。

研究テーマAでは、なぜニューロンが増殖しないのかという問いに対して、ニューロンの細胞分裂を防ぐ仕組みが作動しているという仮説を立て、細胞周期制御タンパク質に着目して生物学的なアプローチで検証を行った。その解析の結果、ニューロンはDNA複製するものの、その後、細胞分裂をせずに細胞死を起こすことが判明した。また、分裂期進行のブレーキとなる仕組みを解明し、そのブレーキを解除する低分子化合物カンプトデシンを同定した。さらに、DNA複製後に細胞死を起こす脳梗塞モデルマウスにおいてカンプトデシンを投与すると、ニューロンが細胞分裂することも見出した。以上の結果から、脳梗塞領域でニューロンを細胞分裂させる技術開発に成功した。

研究テーマBでは、脳梗塞領域における血管再生を目的とした人工足場を作製するために、血管再生を担う機能ドメインとスポンジ形状の人工足場となる構造ドメインをそれぞれ遺伝子工学と合成化学の手法で作製し、アフィニティー結合能を利用して血管新生能を持つスポンジ形状の人工足場を作製した。具体的には、N末端にヒスチジンタグを付加した血管内皮増殖因子(VEGF)を遺伝子工学の手法で作製し、コバルトイオンを結合させたラミニンスポンジを合成化学の手法で作製し、それぞれを混合することでVEGF結合ラミニンスポンジを作製した。VEGF結合ラミニンスポンジは、*in vitro*では血管内皮細胞増殖能を持ち、脳梗塞モデルマウスへの*in vivo*移植では、血管新生能を持つことが明らかとなった。以上の結果から、脳梗塞領域で血管を再構築させる技術開発に成功した。

これらの研究成果はそれぞれDevelopment誌とAdv Healthc Mater誌に掲載され、プレスリリースにより社会に広く発信された。

(2) 詳細

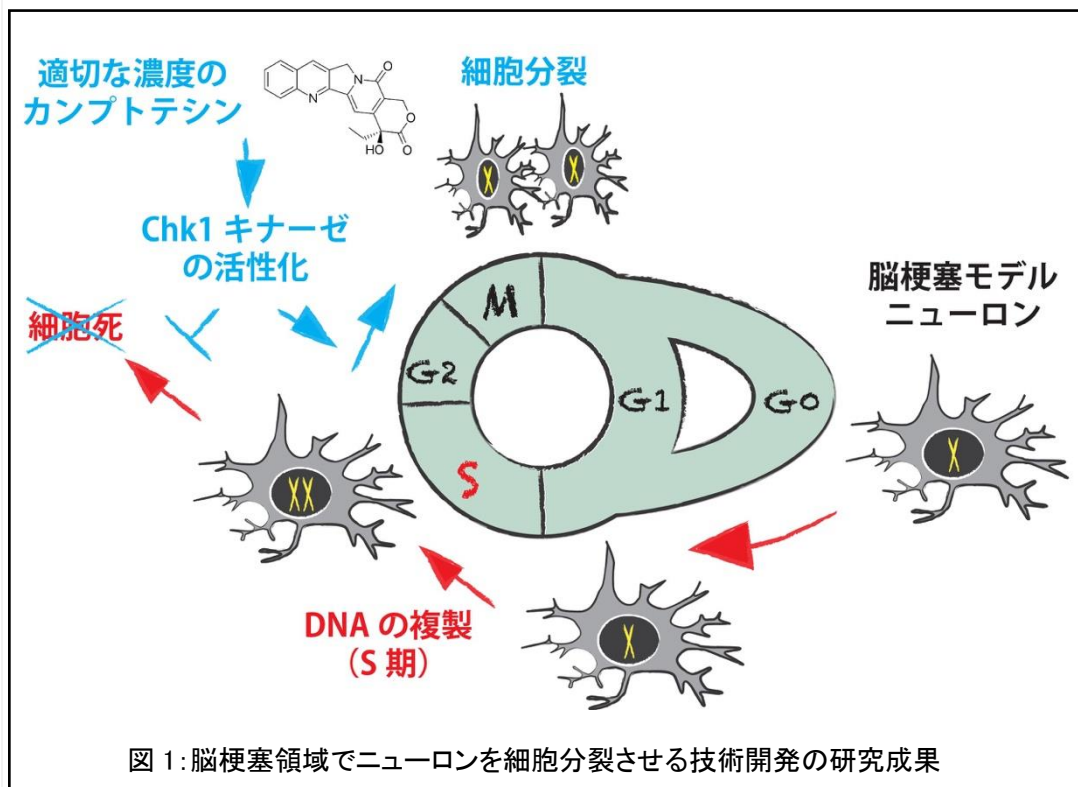
研究テーマA「脳梗塞領域でニューロンを細胞分裂させる技術開発」

細胞が増えるということは、細胞の遺伝情報であるDNAが複製され、それを分配する細胞分裂が繰り返されることである。この一連の過程は細胞周期と呼ばれ、DNA複製をするS期、細胞分裂をするM期、このS期とM期の間にG1期とG2期が存在する(図1)。ニューロンは、細胞分裂を繰り返す神経前駆細胞から主に胎児期において生み出され、分化開始

とほぼ同時に別の細胞周期である G0 期に入ると考えられている。

我々は、これまでの研究で、S 期進行のブレーキとして機能する Rb ファミリータンパク質を欠損させると、一部のニューロンが増えることを発見し、このタンパク質を欠損する時期が、ニューロンが増えるか否かを決定づけることを見だし、ニューロンが潜在的な増殖能力を秘めていることを明らかにした。一方で、過去の様々な研究により、脳梗塞やアルツハイマー病で観察されるニューロン脱落の一部は、Rb のリン酸化に続き、細胞周期を S 期へと進めてから細胞死を起こすということも知られていた。

本研究における研究成果は以下の 4 点にまとめられる。1) S 期進行後にニューロンの細胞死を誘導する Rb ファミリー欠損モデルを確立した。2) そのモデルを用いて M 期進行のブレーキの仕組みを明らかにした。3) そのブレーキを解除する低分子化合物カンプトテシンを同定した 4) S 期進行後にニューロンが脱落する脳梗塞モデルにおいて、カンプトテシン投与で細胞分裂させることに成功した(図 1)。上記 4 点の研究成果を 1 つの論文にまとめて発表し(Oshikawa et al., Development. 2017, 144, 3303-3314)、プレスリリースを行った(「なぜニューロンは増えないのか?」～脳梗塞などで脱落するニューロンを分裂させて補充する革新的な再生医療への期待～ 2017. 9. 19.)。以上から、脳梗塞領域でニューロンを分裂させて補充するという目的は達成された。



研究テーマ B「脳梗塞領域で血管を再構築させる技術開発」

既存の血管から新たな血管を誘引する血管新生は、酸素や栄養分を組織全体に供給する役割を担い、正常組織の発生やがんの悪性化に必須の現象である。そのメカニズムは、

血管が行き渡らず低酸素状態になった細胞から血管新生を誘導するタンパク質、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)が分泌され、周囲に存在する既存の血管から血管新生を誘導するというものである。我々はこれまでの研究で、ニューロンや血管内皮細胞の足場として機能する細胞外基質タンパク質ラミニンを材料にし、スポンジ形状の人工足場、ラミニンスポンジを開発してきた。

本研究における研究成果は以下の 3 点にまとめられる。1) 化学合成と遺伝子工学の手法を組み合わせ、VEGF をラミニンスポンジにアフィニティー結合させ、VEGF 結合ラミニンスポンジを作製した(図 2)。2) 細胞培養下で VEGF 結合ラミニンスポンジが血管内皮細胞増殖能を発揮することを明らかにした。3) マウス脳梗塞モデルの脳梗塞領域に移植し、VEGF 結合ラミニンスポンジが血管新生能を持つことを明らかにした(図 2)。上記 3 点の研究成果を 1 つの論文にまとめて発表し(Oshikawa et al., Adv Healthc Mater. 2017, 1700183)、プレスリリースを行った(「脳梗塞領域に血管を誘引するスポンジ形状の人工細胞足場の開発」～損傷した脳の再生への第一歩～. 2017. 5. 10.)。以上から、脳梗塞領域で血管を再構築させるといふ目的は達成された。

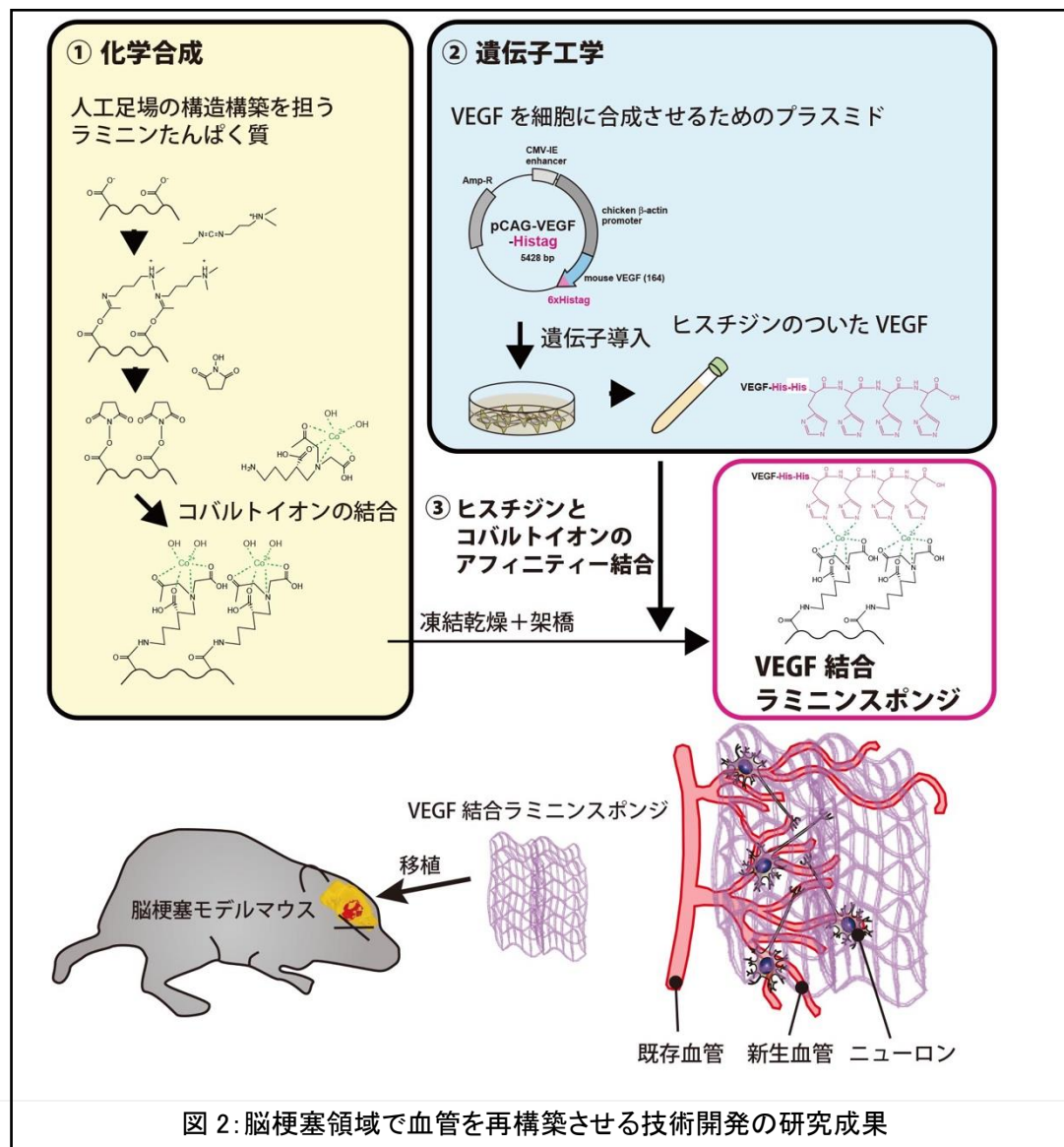


図 2: 脳梗塞領域で血管を再構築させる技術開発の研究成果

3. 今後の展開

本研究により、脳梗塞などの損傷で失われた神経機能を回復させるために必要な基盤要素技術が確立された。今後は、確立した技術を利用し、脳梗塞モデルマウスを用いて失われた神経機能が回復されるかどうか検討すると共に、補充され生着したニューロンが効率的に回路形成できる技術も並行して開発し、現在では治療困難な亜急性期の脳再生治療実現化に向けて研究開発を展開していく。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況に関して、脳梗塞などの損傷で失われた神経機能を回復させるために必要な基盤要素技術の開発を目指し、2つの達成目標を掲げた。1つは、脳ニューロンを分裂させる技術開発であり、もう1つは、脳梗塞領域に血管を再構築させる技術開発である。これら2つの目標は達成され、脳梗塞の亜急性期における神経機能回復を目指す基盤要素技術の確立に成功した。

研究の進め方に関して、研究実施体制は当初のほぼ予定通りで、同一の研究技術補佐員に3年半サポートしていただき、順調に研究が進められた。研究費執行状況も当初のほぼ予定通りで、マウス脳梗塞モデル立ち上げの備品等を購入することができ、順調に本研究を進められ、備品を活用した領域内共同研究も順調に進められた。

研究成果の波及効果に関して、学術面では、神経生物学と分子技術の学際領域研究への発展が期待され、応用面では、JST プレスリリース後に、ベンチャーキャピタルから社会実装に向けたアドバイスをいただき、今後の発展が期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究は、従来の方法論とは全く異なるアプローチによる、挑戦性の高い脳再生の分子技術開発であったにも関わらず、掲げた研究目標2つを達成し、論文発表及びプレスリリースに至った点は高く評価される。

研究実施体制は当初の予定通りで順調に研究が進められ、本研究費で設置した動物実験システムは味岡研究員の独自の研究だけでなく、領域内共同研究にも活用され、本領域全体の発展に貢献した研究の進め方も高く評価される。

本研究の成果は、分子技術を基盤とした神経生物学と材料化学の学際領域研究の成果となり、学術的にはもちろん、脳梗塞の再生治療という大きな社会問題を解決しうる成果として、今後の社会実装への発展も期待される。また、従来の枠を超えた研究分野に挑んだにもかかわらず、国際学会での招待講演も増え、神経生物学に分子技術を取り入れた独創的研究者の一人として国内外で注目されるようになり、研究者としての飛躍にもつながった。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Mio Oshikawa, Kei Okada, Hidenori Tabata, Koh-ichi Nagata, and Itsuki Ajioka# (#責任著者). Dnmt1-dependent Chk1 pathway suppression is protective against neuron division. Development. 2017, 144, 3303–3314
2. Mio Oshikawa, Kei Okada, Naoko Kaneko, Kazunobu Sawamoto, and Itsuki Ajioka# (#責任著者). Affinity-immobilization of VEGF on laminin porous sponge enhances angiogenesis in the ischemic brain. Adv Healthc Mater. 2017, 1700183

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会での招待講演

1. Itsuki Ajioka(ワークショップオーガナイザー). Understanding self-repairing potential by biological and biomaterial engineering approaches for brain regeneration. 25th Biennial Meeting of the ISN. 2015. 8. 25. (オーストラリア・ケアンズ)
2. Itsuki Ajioka(シンポジスト). Neurobiology and biomaterial engineering for the proliferation of neurons. SBNeC Neuroscience Meeting. 2014. 9. 11. (ブラジル・ブジ奥斯)

プレスリリース

1. 「なぜニューロンは増えないのか?」～脳梗塞などで脱落するニューロンを分裂させて補充する革新的な再生医療への期待～ 2017. 9. 19.
2. 「脳梗塞領域に血管を誘引するスポンジ形状の人工細胞足場の開発」～損傷した脳の再生への第一歩～. 2017. 5. 10.