

整理番号	2018-J-023	報告者氏名	味岡 逸樹
------	------------	-------	-------

研究課題名 光で脳内環境を制御するペプチド分子集合体の創製

<代表研究者> 機関名：東京医科歯科大学 職名：准教授 氏名：味岡 逸樹

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

脳神経科学分野のパラダイムシフトを生み出すつつある革新的技術として、オプトジェネティクス（光遺伝学）が挙げられる。オプトジェネティクスは、遺伝学的手法で光応答性タンパク質を神経細胞に発現させ、単一の神経細胞の機能（興奮や抑制など）を光で操作する技術である。オプトジェネティクスの出現により、記憶や情動を司る神経細胞が同定され、その特定の神経細胞を標的とした薬（主に精神疾患）の開発競争が世界中で繰り広げられている。このオプトジェネティクスが神経細胞内の機能を制御する革新的技術として発展を遂げているのに対し、神経細胞の外部、すなわち脳内環境を光で制御する技術開発は未踏の研究領域である。本研究では、多くの脳神経科学者が注目していない、しかし、多くの革新的技術を生み出してきた分子レベルでの材料設計論に基づき、脳内環境を光で制御する基盤要素技術を開発することを目的とした。具体的には、九州大学・楊井伸浩准教授と共同で、オプトジェネティクスの革新的技術開発にみ、生体透過性の高い近赤外光を青色光に変換する三重項-三重項消滅アップコンバージョンゲルを作製し、近赤外光による神経細胞の遺伝子組換えおよび海馬神経細胞の樹状突起形態をコントロールすることに成功した。また、神経細胞の外部から機能制御するための人工足場として、東京農工大・村岡貴博准教授と北里大・渡辺豪講師と共同で、細胞接着能を持ち、従来の超分子ペプチドゲルよりも粘弾性が低く、脳内投与が容易な人工足場を開発した。さらに、これらの基盤要素技術をマウス脳内で作用させるためのマウス脳梗塞モデル実験系を確立した。今後は生体内における三重項-三重項消滅アップコンバージョンゲルを用いた近赤外光オプトジェネティクスへの展開や、脳梗塞モデルの治療効果を持つペプチド分子集合体の探索を進める。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

口頭

1. 味岡 逸樹、村岡 貴博、渡辺 豪.
損傷脳の機能回復を能動的に制御するペプチド分子集合体材料の設計と評価
第69回高分子討論会 2020. 09. 16 オンライン
2. 味岡 逸樹、村岡 貴博、渡辺 豪.
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
第63回日本神経化学学会大会 2020. 09. 12 オンライン
3. 味岡 逸樹.
損傷脳再生を目指した材料化学からのアプローチ
第13回 神経化学の若手研究者育成セミナー 2020. 09. 09 オンライン
4. Itsuki Ajioka,
Cell Cycle Dysregulation: Understanding Neuropathology of Degeneration and Tumor.
XXVII Annual Meeting of Indian Academy of Neurosciences 2019. 11. 20 ニューデリー (インド)
5. Itsuki Ajioka.
Molecular technology regulating the vascular environment for injured brain regeneration.
Neuro2019 2019. 07. 28 新潟
6. 味岡 逸樹.
損傷脳再生を目指した材料化学からのアプローチ.
第三回Neuro-Vascular 研究会 2019. 01. 26 浜松
7. 味岡 逸樹.
損傷脳再生を目指した材料化学からのアプローチ.
第40回神経組織培養研究会 2018. 11. 18 熱海

ポスター

1. 味岡 逸樹, 佐々木 陽一, 押川 未央, 君塚 信夫, 楊井 伸浩.
フォトン・アップコンバージョンゲルの創製による近赤外光オプトジェネティクス.
第92回日本生化学大会 2019. 09. 20 横浜
2. Itsuki Ajioka, Yoichi Sasaki, Mio Oshikawa, Nobuhiro Yanai.
Near-infrared optogenetics by photon upconversion hydrogels.
第11回光操作研究会 2019. 09. 11 名古屋
3. Itsuki Ajioka, Mio Oshikawa, Yoichi Sasaki, Nobuhiro Yanai.
Near-infrared optogenetics by photon upconversion hydrogels.
ISN-ASN Meeting 2019. 08. 07 モントリオール (カナダ)

誌上

1. Sasaki Y, Oshikawa M, Bharmoria P, Kouno H, Hayashi-Takagi A, Sato M, Ajioka I#, Yanai N#, Kimizuka N#.
Near-Infrared Optogenetic Genome Engineering Based on Photon-Upconversion Hydrogels.
Angew Chem Int Ed Engl. 2019 Dec 2;58(49):17827-17833. doi: 10.1002/anie.201911025.
(#co-corresponding authors)

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

<目的>

脳神経科学分野のパラダイムシフトを生み出すつつある革新的技術の1つとして、オプトジェネティクス（光遺伝学）が注目を浴びている。オプトジェネティクスは、遺伝学的手法で光応答性タンパク質を神経細胞に発現させ、単一の神経細胞の機能（興奮あるいは抑制）を光で操作する技術である。オプトジェネティクスの出現により、記憶や情動を司る神経細胞が同定され、その特定の神経細胞を標的とした薬の開発競争が世界中で繰り広げられている。さらに、従来再生しないと考えられてきた脳が損傷を受けた際に神経細胞の機能を再生させることも現実味を帯びてきた。このオプトジェネティクスが神経細胞内の機能を制御する革新的技術として発展を遂げているのに対し、神経細胞の外部、すなわち脳内環境を光で制御する技術開発は未踏の研究領域である。本研究では、多くの脳神経科学者が注目していない、しかし、多くの革新的技術を生み出してきた分子レベルでの材料設計論に基づき、脳内環境を光で制御するための基盤要素技術を開発する。

本研究では、3つの小目標を掲げた。1つ目は、九州大学・楊井伸浩准教授と共同で、オプトジェネティクスの革新的技術開発を目的とした。具体的には、生体透過性の高い近赤外光を青色光に変換する三重項-三重項消滅アップコンバージョンゲルを作製し、神経細胞の形態を近赤外光で制御する技術開発に挑んだ。2つ目は、東京農工大・村岡貴博准教授と共同で、脳内環境を制御できる超分子ペプチド集合体の開発に挑んだ。3つ目は、これらの新技术を齧歯類脳内で作用させるための動物実験モデルの確立とした。

<結果>

【アップコンバージョンゲルを用いたオプトジェネティクス】

従来のアップコンバージョン分子は酸素存在下で失活するため水中ではほとんど機能しなかった。そこで、楊井准教授が中心となり、アップコンバージョンのドナー分子にアクセプター分子を連結させ、より励起寿命の長いアクセプター部位に励起エネルギーを溜めることにより、従来より120倍も長寿命な三重項励起状態を達成した。また、アップコンバージョンゲルを加熱処理する事でミセルの集合状態を変化させ、酸素の侵入を阻害することにより水中作動性アップコンバージョンゲルの開発に成功した。オプトジェネティクスに利用する分子は、光感受性の高い東京大学・佐藤守俊教授が開発したPA-Creを利用した。PA-Creは、青色光照射でDNA組換え酵素Creの活性をコントロールできるオプトジェネティクスツールである。我々は、大脳皮質神経細胞や海馬神経細胞にPA-Creを簡便に遺伝子導入できる実験系を確立し、海馬神経細胞の樹状突起形態を制御できる実験系を確立した。

上記実験系を用いてPA-Creを神経細胞に発現させ、アップコンバージョンゲルを介して近赤外光を照射することにより、神経細胞の遺伝子組換えおよび海馬神経細胞の樹状突起形態を制御することに成功した。

【超分子ペプチド集合体による脳内環境制御】

①ペプチド分子集合体の開発

人工足場の材料として、体内安全性の高いペプチドに着目した。両親媒性ペプチドは疎水性結合やイオン結合により集合体を形成するが、一部のペプチド集合体は、pH やイオン強度の変化でアミノ酸側鎖同士の相互作用が強まりゲル化する。すなわち、試験管内では溶液状で、体内投与後にゲル化するインジェクタブル人工足場としても機能する。最もよく知られているペプチド分子集合体の1つに、アミノ酸16個からなるRADA16 (RADARADARADADA) がある。しかしながら、RADA16は粘弾性が高すぎるため、ガラスキャピラリーによる脳内投与が困難であった。そこで我々は、RADA16よりも粘弾性が低く、脳内投与が容易なRADA16変異体の同定を試みた。

まずはじめに、超分子化学を専門とする東京農工大学・村岡貴博准教授と計算物理学を専門とする北里大学・渡辺豪助教の協力を得て、自己集合化したRADA16の構造を分子動力学(MD)シミュレーションにて解析した。この解析では、1辺10 nmの立方体の中に32分子のRADA16ペプチドと30,000分子の水分子をランダムに配置させ、300ナノ秒間のシミュレーションを行った。その結果、電子顕微鏡解析の結果と同様にシミュレーションでもファイバー状の集合体形状を示した。次に、RADA16のアラニンをグリシンに変えた変異体についても同様の解析を行い、16番目のアラニンをグリシンに置換したRADA16 (A16G)が短い分岐構造を持ったファイバー形状を示すことが明らかとなり、分子間相互作用が弱いながらもファイバー形成することが示唆された。

そこで、村岡らの協力を得て、RADA16とRADA16 (A16G)をF-moc法で合成し、CDスペクトル解析、粘弾性解析、電子顕微鏡解析を行い、MDシミュレーション解析の結果で合致するかどうか検討した。CDスペクトル解析では、どちらも β シート構造を取ることが示唆された。また、粘弾性解析では、RADA16 (A16G)がRADA16の16.6%の弾性率を示し、実際にRADA16より粘弾性が低いことが明らかとなった。

電子顕微鏡解析においてもシミュレーション解析で予想されたように、RADA16 (A16G)ファイバーには多数の分岐構造が認められた。実際、RADA16 (A16G)はガラスキャピラリーを使って容易に脳内投与することができた。

次に、RADA16 (A16G)がRADA16と同様に細胞接着性を持つかどうか検討した。具体的には、1%のRADA16 (A16G)およびRADA16溶液をカバーガラスに塗布し、乾燥後に線維芽細胞を播種した。培養3時間後に接着した細胞数を測定するため、DAPIで核を染色し、ステレオロジーにて細胞数を計測した。その結果、RADA16 (A16G)はRADA16と同様な細胞接着能を持つことが示唆された。

以上の結果から、細胞接着能を持ち、RADA16よりも粘弾性が低く、脳内投与が容易なRADA16変異体、RADA16 (A16G)を同定した。

RADA16 (A16G)足場に任意のタンパク質を非共有結合で配向させ、徐放させる技術開発を検討した。具体的な方法は知財保護の観点から記載を省くが、はじめに緑色蛍光タンパク質GFPを用いてRADA16 (A16G)集合体に非共有結合で配向させる技術と徐放させる技術を確立した。試験管内でのGFP徐放量はELISA法にて評価し、徐放効果を確認した(特願2020-045109)。

【マウス脳梗塞モデルの確立】

我々の開発した超分子ペプチドを投与する損傷脳モデルとして、中大脳動脈遠位部梗塞モデルとローズベンガル投与モデルを検討した。

中大脳動脈遠位部梗塞モデルは以下のように作製した。6週齢のC57BL/6Jマウスを3%イソフルランで麻酔をかけ、右耳の下から目の付近まで皮膚を開けた。次に、側頭筋を切断し脳前方に向けて頭蓋骨から切り離し、頭蓋骨の上から右中大脳動脈遠位部が確認できるようにした。中大脳動脈遠位部を覆う頭蓋骨をマイクロドリルを使って直径1 mm程度の穴をあけ、中大脳動脈遠位部にアクセスできるようにした。微小ピンセットと微小血管焼灼器を用いて中大脳動脈遠位部を切断し、止血ガーゼを当てて止血した。2-3分後に止血ガーゼを取り除き、ヒーターマットの上でマウスの回復を待った。

ローズベンガルモデルは以下のように作製した。6週齢のC57BL/6Jマウスを3%イソフルランで麻酔をかけ、脳定位装置にセットした。ブレグマの上下4 mmが露出するように、頭蓋骨を覆う皮膚を開いた。ブレグマから「右方0.7 mm、前方2.5 mm」、「右方0.7 mm、後方1.0 mm」、「右方2.7 mm、後方1.0 mm」、「右方2.7 mm、前方2.5 mm」の4点に印を付け、その周辺部を遮光テープで覆った。その後、10 mg/mlのローズベンガル溶液を100 μ l腹腔内投与し、5分後にハロゲンランプで上記長方形領域を10分間照射した。照射後は皮膚を閉じ、ヒーターマットの上でマウスの回復を待った。

手術7日後に歩行機能解析を行い、その後、4% PFAで灌流固定した。歩行機能解析は、名古屋市立大学・澤本和延教授と金子奈穂子准教授の協力を得て、実験系を立ち上げた。具体的には、亀甲金網の上で術後マウスを10分間自由に歩かせ、動画を記録し、総歩数と亀甲金網から足を滑らせた回数を測定し、足を滑らした割合を算出した。形態学的解析は、ニューロンのマーカーNeuNと活性化ミクログリアのマーカーIba1の免疫組織染色で損傷領域を観察した。ローズベンガルモデルでは、大脳皮質運動野を光照射したが、形態学的解析でも大脳皮質運動野の障害が確認された。一方、中大脳動脈遠位部梗塞モデルでは、血管支配領域である大脳皮質連合野の障害が確認された。歩行機能解析では、どちらのモデルでも歩行機能異常が認められ、どちらのモデルの実験系確立にも成功した。

<考察>

本研究において、1) 三重項-三重項消滅アップコンバージョンゲルを用いた近赤外光オプトジェネティクスに世界に先駆けて成功した (Sasaki et al., *Angew Chem Int Ed Engl.* 2019)、2) 脳内投与が容易なペプチド分子集合体を開発し (投稿中)、3) これらの新技術を齧歯類脳内で作用させるための動物実験モデルを確立した。今後は生体内における三重項-三重項消滅アップコンバージョンゲルを用いた近赤外光オプトジェネティクスへの展開や、脳梗塞モデルの治療効果を持つペプチド分子集合体の探索を進める。