

神経組織を再生させる機能を有する細胞足場マトリックスの創製

プロジェクト
責任者

近畿大学 生物理工学部

教授 森本 康一

プロジェクト概要

断裂神経束の治療において中枢神経の再建は未だ困難であり、損傷部位への神経幹細胞の誘導、増殖と分化、神経突起の伸長などに働く材料開発とその検証が急務である。我々はこれまでに海馬由来初代神経細胞が強く接着し、神経軸索の伸長などを促進する細胞低接着性コラーゲン(LASCol, Low Adhesive Scaffold Collagen)を開発し、LASColはアテロコラーゲンにはない細胞機能を亢進させることを明らかにしてきた(図1)。本研究課題では、LASCol上で培養した神経細胞で発現するタンパク質をLC-MS/MSで新たに同定し、さらにラット損傷脊髄の再生効果を示すLASColの最適濃度などを調べ、細胞移植に頼らない神経再生を目指した。

【神経細胞の培養】

ラット新生仔海馬由来の神経細胞をLASCol, アテロコラーゲンまたはポリ-L-リジン(PLL)を塗布した培養皿に播種して経時的に観察した結果、LASCol上の神経細胞はアテロコラーゲン上やPLL上と比較して、神経突起の伸長が誘導される(図2)とともに特有のタンパク質の発現が主成分分析で示された(図3)。

【脊髄損傷モデルラットを用いた動物実験】

LASColゲルをラットの脊髄損傷部に埋入し、in vivoでの神経再生効果を免疫組織化学的に解析した結果、LASColを埋入したラットの脊髄損傷部に再生神経の伸長を示すpGAP-43陽性の軸索が認められた。また、脊髄損傷ラットの運動能回復の指標となるBBBスコアで、LASCol埋植群はコントロール群に比べて有意な回復上昇が認められた(図4)。

【結論】

神経再生を促して損傷脊髄を修復する新しい機能性コラーゲンを見出した。間葉系幹細胞などの移植以外の治療の可能性を示した。

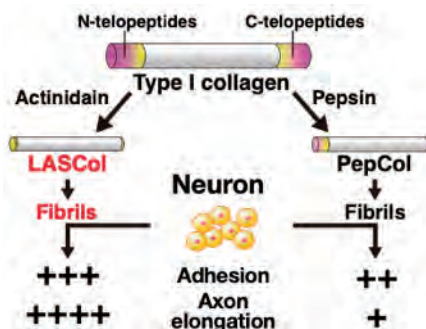


図1 LASColで培養したラット海馬由来神経細胞は接着性が増加し、神経軸索が太く長く伸長した。

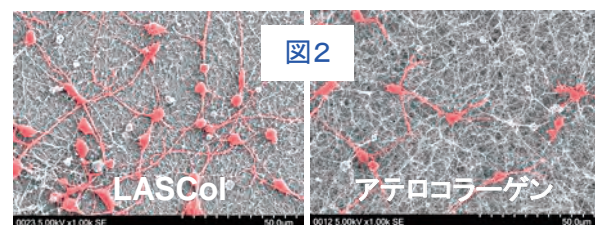


図2

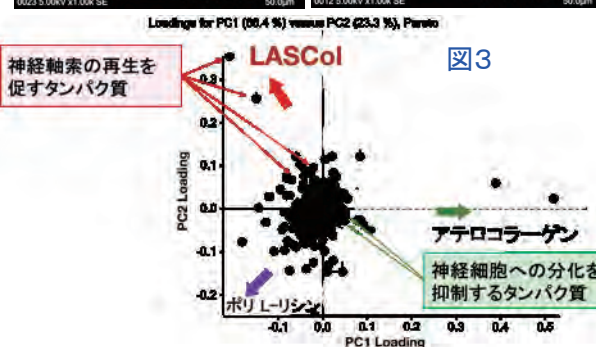
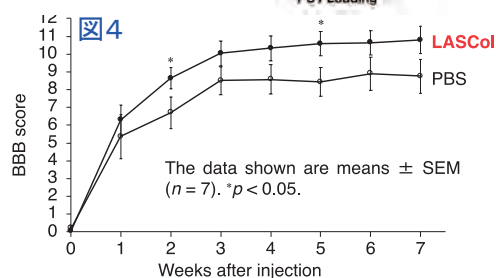


図3



3 脊髄損傷ラットの歩行運動の評価。挫滅損傷ラットの損傷部にLASColゲル（コントロール群はPBS）を注入し、7週間にわたってBBB (Basso-Beattie-Bresnahan) スコアによる評価を行った。

【共同研究機関】近畿大学生物理工学部、藍野大学中央研究施設、
神戸医療産業都市推進機構医療 イノベーション推進センター

【対象疾患】

末梢神経断裂・欠損(手根管開放手術等:国内1.5万人/年、世界不明)

中枢神経断裂・欠損(脊髄損傷:国内10万人、250万人)

【出願特許】国内特許成立 第7012970号、米国と中国に出願中、2者共願(近畿大学・藍野大学)

【希望する企業連携の内容】引き受け企業を探しています(LASColの製造企業は確保)

Development of a novel scaffold suitable for the regeneration of injured nerve tissues

Principal Investigator

Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University

Professor Koichi MORIMOTO

Project Outline

We succeeded in developing low adhesive scaffold collagen from porcine skin (**LASCol**). The cells on LASCol coated-dish collide each other one after another and get to form cell aggregates (spheroids) larger (**Fig. 1**). In this study, we report that LASCol markedly activates function of neuron *in vitro* and facilitates new axon regeneration in rat spinal cord injury part.

We analyzed the effects of LASCol on neuronal cells in culture system. At first, neurons derived from newborn rat hippocampus were seeded on a culture dish coated with LASCol, atelocollagen or poly-L-lysine (PLL). As a result, it was revealed that neurons on LASCol have increased cell viability and remarkably elongated neurites as compared with cells on atelocollagen or PLL (**Fig. 2**). On the other hand, astrocytes derived from rat brain rarely adhered on LASCol and the proliferation was suppressed compared with astrocytes on other coated dishes. Therefore, it was suggested that LASCol is a scaffold that acts specifically on nerve cells.

Furthermore, axon regeneration was evaluated *in vivo* using a contusion model of spinal cord injury in the rat. LASCol gel or PBS as control was injected in the lesion site a week after injury. As a result of immunohistochemical analysis, pGAP-43-positive regenerating axons were markedly extended into the lesion site in the LASCol-treated group. Additionally, in the LASCol-treated group, the locomotor behaviors evaluated by the Basso-Beattie-Bresnahan score were markedly improved (**Fig. 3**).

Therefore, LASCol would be a promising candidate as a scaffold for the treatment of spinal cord injury.

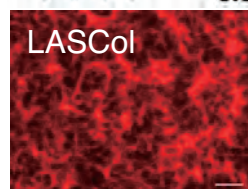
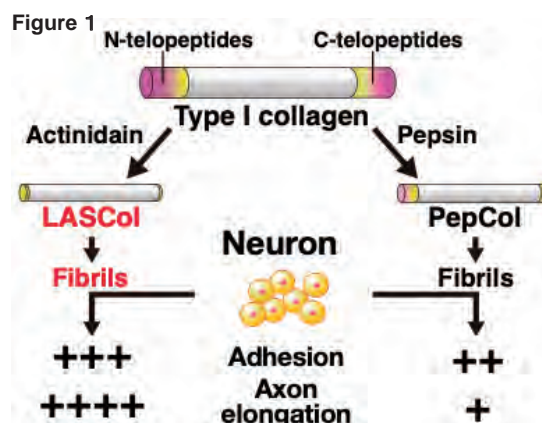


Figure 2
Immunofluorescence staining of rat neuron by using anti-III-tubulin antibody (red).

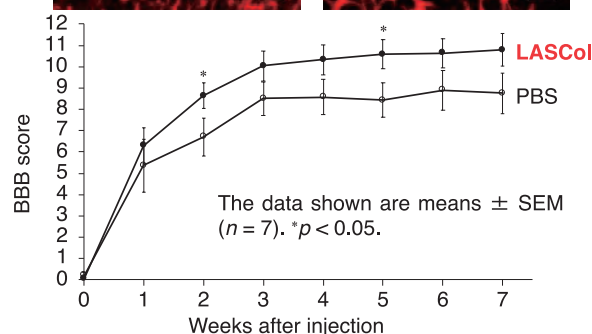
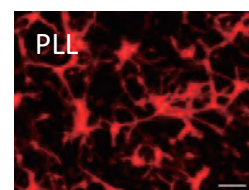
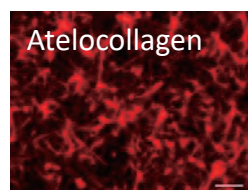


Fig. 3 Evaluations of locomotor behaviors. The Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scores were evaluated over 7 weeks after injection of LASCol. A severe contusion injury was employed in the present study.

Research & Development: Kindai University, AinoUniversity, & Research Center for Medical Innovation

Patent: Patent No. 7012970 (Japan), pending in USA & China, PCT/JP2019/003502