

令和元年6月28日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08562

研究課題名(和文) バイオドラッグデリバリーシステムを用いた新規心筋再生治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cardiac regeneration therapy using a bio-drug delivery system

研究代表者

伊井 正明 (Ii, Masaaki)

大阪医科大学・研究支援センター・講師

研究者番号：10442922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス心筋梗塞モデルで治療効果を比較検討した。超音波画像診断による心収縮能は、PBS投与群に比べてSimNP投与群とAdSC投与群では改善効果は認められなかったが、SimNP-AdSC投与群では有意な改善が認められただけでなく、梗塞巣の心外膜側に新生肉芽組織を認め、多数のNkx2.5陽性の幼弱な心筋細胞の集まり組織であることが判明した。さらに、治療2ヶ月を経過した心臓に内因性再生心筋が認められた。胎生期発生関連因子WT-1陽性の心外膜側の新生肉芽組織に増殖マーカー(Ki67)と共陽性になる細胞が多数認められたことから、心外膜由来WT-1陽性細胞が心筋細胞に分化することで組織再生が誘発された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果によって、心筋梗塞を代表とする重症虚血性心疾患難治性心疾患に対する新たな心筋組織再生治療法を開発できる可能性がある。また、本治療技術が実用化されれば、簡便かつ安価な細胞製剤を心筋梗塞治療薬として利用できるため、欧米諸国や発展途上国などで開胸手術や心臓カテーテル治療などの高額医療を受けることができない患者に対するの福音となる可能性がある。さらに、AdSCは心血管系以外の細胞への分化能も有し、炎症巣や腫瘍にも集積する性質を持っているため、PLGAナノ粒子に含有させる薬剤を変更することによって、他疾患治療への波及効果もある点で意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the hypothesis that statins, which have pleiotropic effects, augment the therapeutic potential of AdSCs and that AdSCs also act as drug delivery tools. Simvastatin-conjugated nanoparticles (SimNPs) significantly promoted migration activity without changing proliferation activity and up-regulated growth factor gene expression in vitro. A small number of intravenously administered SimNP-loaded AdSCs improved cardiac function following myocardial infarction, inducing endogenous cardiac regeneration in the infarcted myocardium. The de novo regenerated myocardium was thought to be derived from WT-1 positive epicardial cells. These findings were attributed to the sustained, local simvastatin release from the recruited SimNP-loaded AdSCs in the infarcted myocardium. SimNP-loaded AdSCs may lead to a novel somatic stem cell therapy for IHDs.

研究分野：再生医療

キーワード：心筋再生 スタチン 間葉系幹細胞 DDS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

わが国における死因第2位の疾患である心疾患に罹患し、入院を余儀なくされる患者は増加の一途をたどっており、国民のQOLを低下させるだけでなく医療費を増加させ国家経済に対しても負の影響を及ぼしている。このような観点から、罹患率の高い虚血性心疾患に対する簡便かつ安価な新規治療法の開発が望まれている。

AdSCは容易かつ多量に分離でき筋・血管系細胞への分化能を有するため、(Planat-Benard, et al. Circ Res, 2004) 虚血傷害または変性心筋の組織再生を目的とした再生医療への応用が期待され、欧米ではすでに虚血性心疾患に対する自家細胞移植による臨床試験が実施されている。(Meliga, et al. Cell Transplant, 2007)

このようなAdSCの持つ組織再生能とは別に、我々はこれまでにAdSCの腫瘍細胞増殖抑制作用と腫瘍集積性に着目し、抗癌剤含有ナノ粒子をAdSCに抱合させた細胞移植による腫瘍選択的ドラッグデリバリーシステムをすでに確立(H25年度基盤(C))した。また、AdSCは腫瘍のみならず、虚血心筋傷害組織にも集積することを予備実験にて確認しており、抗癌剤と同様に乾前駆細胞機能を活性化させるスタチン製剤の傷害心筋における局所選択的ドラッグデリバリーおよび薬剤徐放が可能になるという着想に至った。

### 2. 研究の目的

脂肪組織由来幹細胞(adipose-derived stem cell: AdSC)は、再生医療としての自家細胞移植ソースとして期待されているが虚血心筋組織に集積する性質を合わせ持つ。一方、スタチン(Statin)製剤は血清コレステロール低下作用以外に内皮細胞を活性化し、骨髄由来幹前駆細胞を動員して虚血組織において血管新生を促進することが知られている。

本研究では、AdSC移植とStatin製剤の局所徐放システムを併用することにより、心筋梗塞などの虚血性疾患に対して機能的な心筋組織再生のための新しい治療法の開発を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

徐放化Statin-PLGAナノ粒子含有AdSC移植による選択的かつ効果的な治療効果を得るため、まずはStatinの細胞外への徐放化とAdSC細胞機能増強という観点でAdSC内へ抱合させるStatin-PLGAナノ粒子の組成条件を最適化するためのin vitro実験を中心に行った。次に、最適化されたStatin-PLGAナノ粒子抱合AdSCの心筋再生治療効果の再現性確認のためにin vivo実験を開始する。そして、In vivo実験開始とともに治療効果のメカニズム解明を目指し、組織学的および分子生物学的な各種解析を行った。

### 4. 研究成果

生分解性ポリマーPLGAにStatin(Simvastatin, Sim)を封入した薬剤徐放化ナノ粒子(Nanoparticle, NP)を作製(SimNP)し、薬剤封入率を測定したところ3%前後であった。次に、SimNPを実験に用いてAdSCに抱合

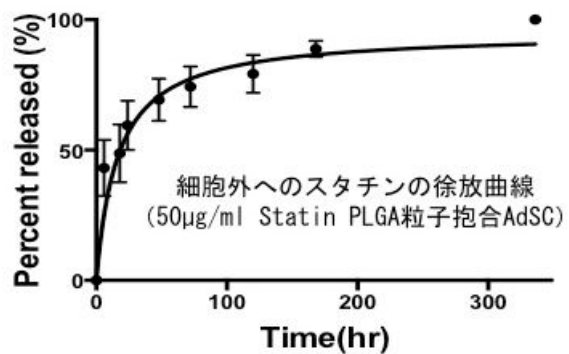
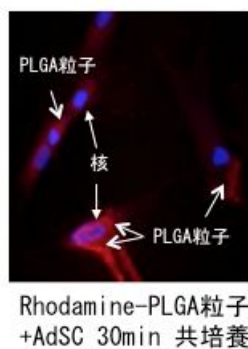


図1: AdSCによるStatin-PLGA粒子の抱合(共焦点レーザー顕微鏡画像)と薬剤徐放

(AdSC  $5 \times 10^4$  コに対して SimNP: 50 µg) (SimNP-AdSC) させた後に細胞外への Simvastatin の放出(徐放)を経時的に測定し確認した。(図1)

SimNP-AdSCの細胞機能の評価したところ、SimNP 10µg/10000個の抱合量で増殖能は変化させずに遊走能を有意に亢進させた。(図2)

次に、マウスを用いた動物実験を行った。左冠動脈を結紮して誘発したマウス心筋梗塞モデルに対して、赤色蛍光色素

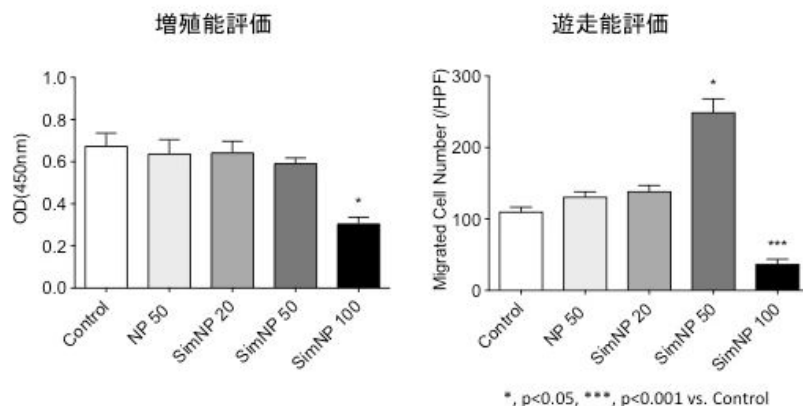


図2: Statin-PLGA粒子抱合後のAdSCの機能変化

(Rhodamine) でラベルした SimNP-AdSC ( $1 \times 10^5$ /匹) を尾静脈より全身投与したところ、虚血性傷害心筋に集積する組織像が確認できた。(図3)

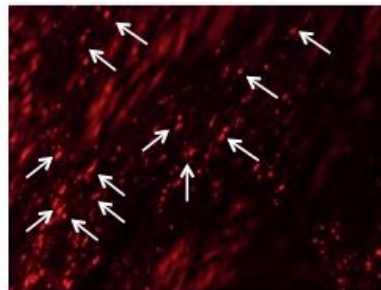


図3: Rhodamine-NP-AdSC(矢印)の梗塞3日後の心筋組織への集積

以上の結果から、AdSC が薬剤封入 NP を心筋梗塞の病巣に運ぶドラッグデリバリーツールとして利用できることが明らかとなった。

引き続き、SimNP を AdSC に抱合させた細胞を用いて心筋梗塞に対する治療効果を確認した。マウス心筋梗塞モデル作製 3 日後に尾静脈経由で、1. PBS 投与 (Control 群) 2. SimNP 投与 (SimNP 群) 3. NP-AdSC 投与 (NP-AdSC 群) 4. SimNP-AdSC 投与 (SimNP-AdSC 群) を行い、心筋梗塞誘発後 1 ヶ月、2 ヶ月の時点で心臓を採取し解析を行った。超音波画像解析結果 (図4) 組織形態学的解析結果 (図5) 免疫組織化学的解析結果 (図6) を以下に説明とともに示す。

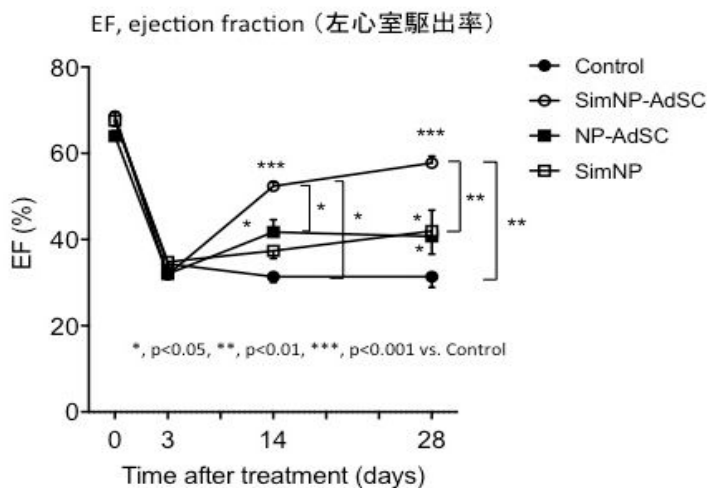


図4: 超音波画像解析  
心筋梗塞3日後に低下した左室駆出率の改善が、SimNP-AdSC >> NP-AdSC, NP-AdSC > Controlの順に認められた。

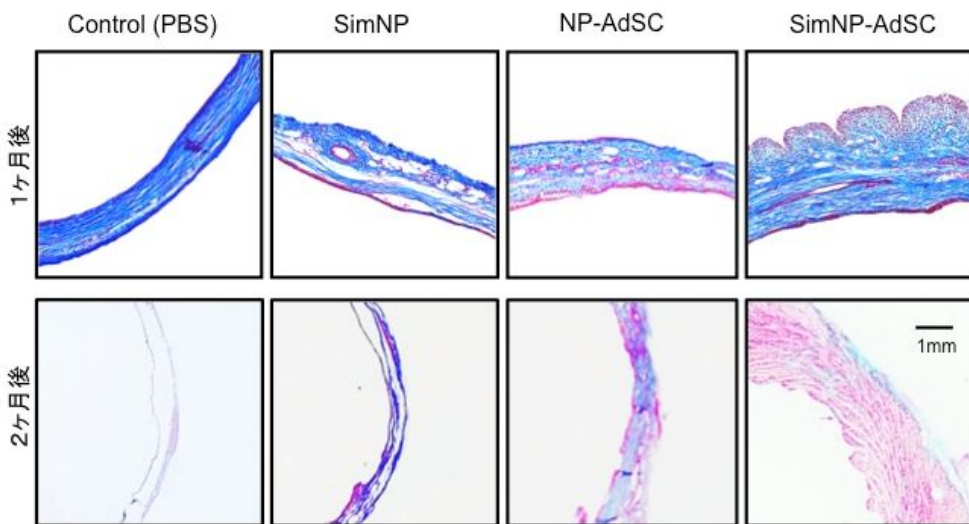


図5: 組織形態学的解析 (マッソントリクローム染色)  
心筋梗塞によって心筋が傷害され壊死した後に置き換わった繊維化(青色)部分が、SimNP-AdSC群だけ新たな心筋組織(1ヶ月: 肉芽組織、2ヶ月: 成熟心筋)の再生が認められた。



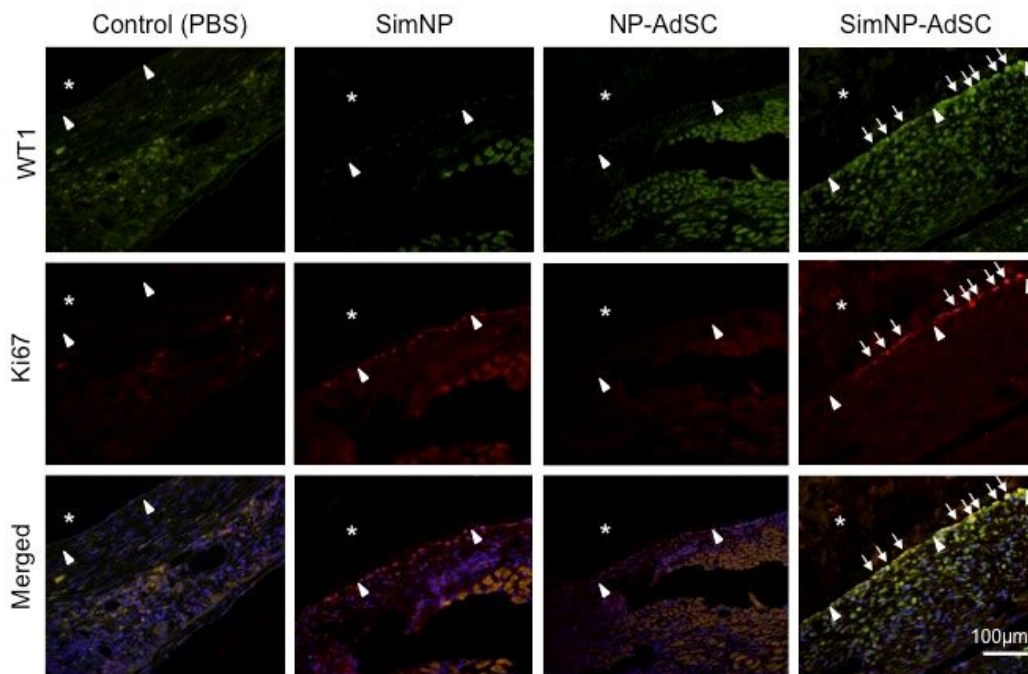


図6:免疫組織化学的解析(緑:WT1、赤:Ki67、青:DAPI核)  
 心筋梗塞3週間後の虚血傷害心筋組織において、胎生期発現蛋白WT1陽性細胞が多数認められ、心外膜に一致してKi67陽性増殖細胞も観察された。このことから、心外膜由来の未分化細胞が分裂増殖した後に心筋細胞に分化したものと考えられる。(\*, 心外側、矢頭, 心外膜)

以上の研究成果から、これまで再生しないとされてきた心筋組織の自己再生が確認できた。今後、この技術を活用することによって新たな心筋梗塞治療法開発の可能性が期待できる。特筆すべき点は、脂肪幹細胞は体性幹細胞のうちの一つで癌化しないとされており、iPS細胞のように合成が必要な細胞ではなく、簡便な処置で得られる脂肪組織から幹細胞を速やかに大量に分離培養できる点、Simvastatinはすでに臨床で利用されている薬剤であり、あらたな化合物の開発の必要性がない点、人体への安全性も確認され、化粧品や医薬品に用いられているPLGAポリマーナノ粒子を用いる点などから、低コストで迅速な臨床応用が実現可能であると思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Yokoyama R, Li M, Masuda M, Tabata Y, Hoshiga M, Ishizaka N, et al. Cardiac Regeneration by Statin-Polymer Nanoparticle-Loaded Adipose-Derived Stem Cell Therapy in Myocardial Infarction. *Stem Cells Transl Med.* 2019. 査読あり

〔学会発表〕(計 1件)

Li M, Koishi Y, Shiraoka C, Nemoto S, Intravenous Infusion of Statin-Nanoparticle-Loaded Stem Cells Improve Myocardial Infarction With Cardiac Regeneration, November 6, 2018, 米国心臓学会

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：炎症性疾患治療用幹細胞の機能増強用スタチン封入ナノ粒子製剤、及びそれを含有する炎症性疾患治療用機能増強幹細胞

発明者：伊井正明、田畑泰彦

権利者：学校法人大阪医科薬科大学

種類：特許

番号：特願 2016-166299

出願年：平成29年

国内外の別：日本国、外国(中国・韓国・米国・欧州・インド・タイ・ベトナム)

取得状況(計 1件)

名称：幹細胞機能増強用スタチン封入ナノ粒子製剤、並びにそれを含有する機能増強幹細胞及

びその製造方法

発明者：伊井正明、田畑泰彦

権利者：伊井正明（日本）、先端医療振興財団（外国）

種類：特許

番号：特許 6110578 号

取得年：平成 28 年

国内外の別：日本国、外国（中国・韓国・米国・欧州・インド）

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当なし

(2) 研究協力者 該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。