

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18052

研究課題名（和文）新規高分子ミセル溶液による虚血再灌流障害抑制法の開発

研究課題名（英文）Development of IRI remission technology with Polymer micelle injection.

研究代表者

岡本 竜弥（Okamoto, Tatsuya）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70767293

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：ゼラチンとポリエチレングリコール（PEG）から成る生体へ応用可能な両親媒性高分子を作成した。この分子が水溶液中でナノサイズのみセルを形成する事を明らかにし、再生誘導因子であるHMGB-1フラグメントをを内包した高分子ミセルを調整した。このミセルをラット小腸虚血再灌流障害モデルに投与したところ、虚血再灌流障害からの早期回復が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体吸収材料であるPEGとゼラチンからなる高分子ミセルを用いて組織修復誘導因子であるHMGB-1フラグメントをコントロールリリースする事により、小腸の虚血再灌流による組織障害の回復促進が得られる事を示した。この成果は、臓器移植に伴う虚血再灌流障害の早期回復に対する新しい治療法へ繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We prepared an amphiphilic polymer composed of gelatin and polyethylene glycol (PEG) that can be applied to living organisms. The molecules were found to form nano-sized micelles in aqueous solution, and polymeric micelles encapsulating the HMGB-1 fragment, a regeneration-inducing factor, were prepared. When the micelles were administered to a rat model of ischemia-reperfusion injury of the small intestine, early recovery from ischemia-reperfusion injury was observed.

研究分野：再生医学

キーワード：虚血再灌流障害 高分子ミセル HMGB1-フラグメント

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植において、ドナー臓器は慢性的な不足状態にあるため、高齢ドナーや、心停止ドナーなどの利用推進が近年図られているが、これらいわゆる Marginal donor からの臓器移植においては、移植後の虚血再灌流障害による移植後無機能及び遷延性機能障害が高率に発生する点が問題となる。申請者らは当初、高分子ミセルの持つ、疎水性物質に対する内包能力に着目し、これを臓器保存液、もしくは灌流液へ添加することで、虚血再灌流時に放出されるサイトカイン、炎症性メディエーター等がミセル内部へ捕縛され、その作用が緩和されるのではないかと考え、当初実験を開始した。しかしながら、非機能性の高分子ミセル単独での虚血再灌流抑制はやや困難であったことから、同ミセル中に間葉系幹細胞の遊走誘導因子である HMGB-1 フラグメントを内包させ、この HMGB-1 フラグメント内包ミセルを用いる事で虚血再灌流による組織障害の修復促進効果が得られるかを検討した。

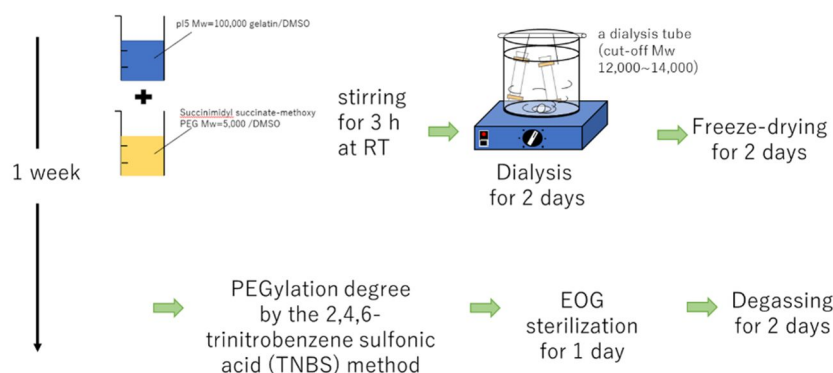
### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体へ応用可能な両親媒性高分子を用いて高分子ミセルを作成し、さらに炎症性メディエーターやその抑制因子を内包した高分子ミセルを調整して、これを生体に応用する事によって、虚血再灌流障害からの早期回復が事を提示する事である。

### 3. 研究の方法

1) Polyethylene glycol(PEG)導入ゼラチンの作成；平均分子量 100,000、等電点 5 のゼラチン分子側鎖に Methoxy PEG Succinimidyl Succinate をアミド結合にて側鎖へ導入し、PEG 導入ゼラチンを作成した ( 図 1 )

図1: PEG導入ゼラチン作製法 (scheme)



2) PEG 導入ゼラチンの水溶液中でのキャラクタリゼーションの確認；動的散乱法(DSL)及び高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) にて同分子が水溶液中でナノサイズのミセルを形成している事を確認。

3) PEG 導入ゼラチンによる HMGB-1 フラグメントの内包効率の測定；HPLC 及び BCA assay によるタンパク定量法により測定。

4) ラット小腸虚血再灌流モデルの作成及び HMGB-1 フラグメント内包ミセルによる組織修復効果の測定；血管外漏出を色素、蛍光分子投与等にて測定。血管内皮の障害等については組織切片の染色、免疫染色、活性酸素染色のほか、血中活性酸素種測定、炎症性メディエーターの ELISA 測定を行う。

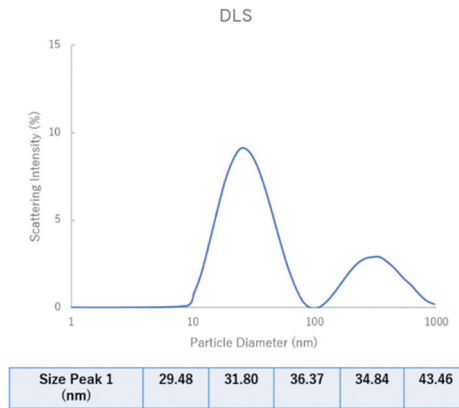


図2: PEG導入ゼラチンの水溶液中における会合体サイズ測定

#### 4. 研究成果

上述の研究方法 1) に従い PEG 導入ゼラチンを作成した。また、これが水溶液中にて約 30nm サイズのナノミセルを形成する事を DSL にて測定した (図 2)。

また、この PEG 導入ゼラチンによる HMGB-1 フラグメントの内包効率を HPLC 及び BCA assay 法により測定し、内包効率が最大になる配合比率を見出した (図 3)。

HMGB1 peptide 1000ug / PEG-gelatin 10mg

4°C / 1h

Temperature (°C)	Time (h)	Introduction rate (%)	HMGB1 peptide (ug)	PEG-gelatin (mg)	Introduction rate (%)
4	1	55	500	10	100
4	4	66	600	10	100
4	24	47	700	10	78
25(RT)	1	47,67	800	10	70
25(RT)	4	48	1000	10	55
			2000	10	32

図3: PEG導入ゼラチンによるHMGB-1ペプチド内包効率の測定

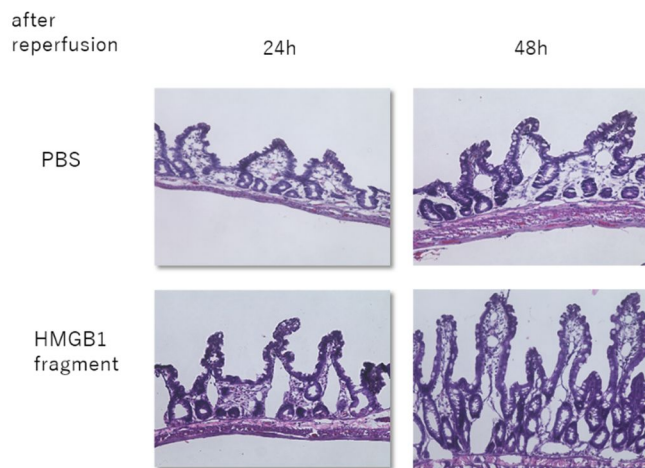


図4: 小腸絨毛の再生促進効果

この HMGB-1 フラグメント内包ミセルによるラット小腸虚血再灌流障害モデルに対する障害抑制効果について検討したところ、虚血再灌流障害 24 時間後の時点では、コントロールと HMGB-1 フラグメント内包ミセル投与群の間で、小腸絨毛障害の程度は同一であったが、48 時間後の測定ではミセル投与群において絨毛丈の修復が有意に進んでいる事が確認された (図 4)。

今後この修復促進効果の詳細とメカニズムにつき検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------