

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K24089

研究課題名（和文）組織注入可能な足場を利用した幹細胞注入による筋再生について

研究課題名（英文）Muscle regeneration using an injectable scaffold

研究代表者

松川 誠（MATSUKAWA, MAKOTO）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70845859

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は組織内に注入可能な足場材を用いた筋組織の再生を目的とした。脂肪幹細胞凝集体（ASCs）を多結晶版血漿（PRP）などの細胞増殖因子を含有したゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子と共に局所投与を行うことで、ASCsの局所生着率が向上する。さらにPRPに含まれる細胞増殖の中で最も筋再生に有用なPDGF-BBを含浸させたハイドロゲルをASCsと共にマウスの下肢に局所投与し、筋負荷を与えることで、筋再生が促進されることが明らかとなった。PDGF-BB含有ゼラチンハイドロゲルマイクロ粒子は局所投与可能な足場材であり、局所的な筋再生に有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は組織内に注入可能な足場材を用いた筋組織の再生を目的とした。脂肪幹細胞凝集体（ASCs）をPDGF-BBを含浸させたハイドロゲルと共に局所投与し、筋負荷を与えることで、筋再生が促進されることが明らかとなった。この技術はにより筋組織再生の選択の幅が広がり、患者の生活の質向上に貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to regenerate muscle tissue using a scaffold material that can be injected into the tissue. Local injection of adipose stem cell aggregates (ASCs) together with gelatin hydrogel microparticles containing cell growth factors such as polycrystalline plasma (PRP) improves the local engraftment rate of ASCs. In addition, local injection of hydrogel impregnated with PDGF-BB, which is the most useful for muscle regeneration in PRP, with ASCs to the leg of mice and applying muscle load promotes muscle regeneration. PDGF-BB-containing gelatin hydrogel microparticles are scaffolds that can be applied topically, and have been shown to be useful for local muscle regeneration.

研究分野：再生医療

キーワード：注入 筋再生 ゼラチンハイドロゲル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の学術的背景、研究課題の核心をなす学術的「問い」

我々の施設は口唇裂・口蓋裂における日本で有数の中核施設であり、「口唇裂・口蓋裂・口腔顔面成育治療センター」を設置し、数多くの患者の治療に携わっている。

口蓋裂患者は、1歳前後で左右に分散された口蓋帆挙筋を再構築する手術を受けるが、術後に癒痕が強が残ったり、筋の再構築が不十分であったり、筋組織自体がもともと弱かったりすると、術後も鼻咽腔閉鎖不全が残る場合があり、構音障害が生じる。鼻咽腔閉鎖不全症の救済策としてスピーチエイドと呼ばれる補綴装置の装用や咽頭弁形成術などの外科手術に限られる。前者については常に装用が必要であり、若年者や高齢者であれば装置の管理が問題となる。また後者の場合は口腔咽頭の形態を非生理的な形態へ変化させることとなり、外科的な侵襲の大きい治療が必要となる。当施設ではこれらの問題を解決させる鼻咽腔閉鎖不全症に対する新規治療法として軟口蓋に自家脂肪移植術を施行している。しかしながら、口蓋形成術後の軟口蓋は移植床としての条件としては厳しく、長期的な安定についてはさらなる改良が必要である。難治性鼻咽腔閉鎖不全症に対する新規療法の改良とし、ゼラチンハイドロゲルなどの組織内に注入可能な足場材と脂肪幹細胞を用いた筋再生に着目した。これらの材料は培養シートや多孔性ブロックを用いた移植治療と異なり、組織に注入可能なことから創部を開く必要がなく、侵襲の小さい治療が可能となる。さらに脂肪幹細胞移植は他家移植でも免疫抑制が不要なことが知られている。そのため脂肪採取手術を省略可能となり、現在当施設で試行している自家脂肪移植に比べても侵襲の小さい治療が可能となりえる。また、この手法を応用すれば鼻咽腔閉鎖不全症以外の筋疾患の治療にも貢献することが可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は組織内に注入可能な足場材の開発および筋組織再生を検証することであり、実現すれば難治性の鼻咽腔閉鎖不全に対する新たな治療法が提案できる。培養シートや多孔性ブロックなどを用いた研究は進んでいるが、組織内に注入可能な足場材における研究は未だ進んでいない。培養シートや多孔性ブロックは挿入時に創部を開く必要があり、侵襲が大きくなるが、注入可能な足場材であれば侵襲を減らせる上に、形態を自由に形成することが可能であるため複雑な形態の移植床にも対応可能となる。さらに、足場に筋細胞に誘導する物質をあらかじめ組み込めば、幹細胞を採取したその場で、足場と混入させて注入することも可能となる。また、この手法を応用すれば鼻咽腔閉鎖不全症以外の筋疾患の治療にも貢献することが可能であると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 各移植媒体を用いた幹細胞移植がラット咬筋組織に及ぼす影響

実験には Sprague-Dawley 系成獣ラット 8 週齢雌を 96 匹用いた。ゼラチンハイドロゲル (IG) による注入法を用いたラット咬筋への脂肪幹細胞凝集体 (ASCs) 同種他家移植を行った。

咬筋への幹細胞移植後 2、7、14、28 日目で、安楽死させ、両側咬筋を摘出した。HE 染色を行い、筋腹、筋線維など筋線維の形態学的評価、筋組織内に残存している IG や細胞増殖因子 (GF) 徐放粒子とその周辺の形態学的評価、炎症細胞浸潤程度の評価など、組織学的な評価を行った。さらに免疫組織学的検討を行い、CD31 および Myo-D の発現を確認した。

### (2) ASCs の筋分化に有効な因子の検索

PRP の成分である HGF、G-CSF、IGF、TGF- $\beta$ 、PDGF-AA、PDGF-BB のいずれが ASCs の筋へ分化に最適かを *in vitro* にて検証おこなった。上記因子を筋誘導培地に添加し、ASCs を 14 日間培養後に DAPI、Myo-D を用いて免疫染色を行い、Myo-D 陽性率 = (Myo-D 陽性細胞数 / DAPI 陽性細胞数)  $\times$  100 を算出した。

### (3) マウス筋組織への ASCs 移植による筋力増強に関する検証

生後 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、ASCs の移植後の筋機能の変化について検討を行った。移植は PBS のみ (PBS)、PDGF-BB (1  $\mu$ g/ml) を含浸したハイドロゲル (PDGF-BB+ゲル)、

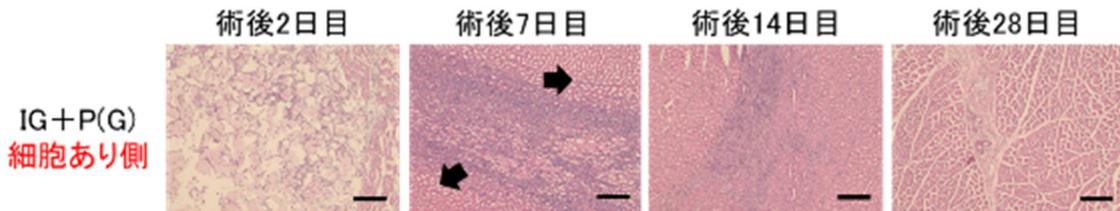
ASCs + PBS を含浸したハイドロゲル含有細胞凝集体 (ASCs+ゲル)、ASCs + PDGF-BB (1  $\mu$ g/ml) を含浸したハイドロゲル含有細胞凝集体 (ASCs+PDGF-BB+ゲル) の 4 群 (n=5) とし、両側のヒラメ筋への他家移植を行った。移植 2 日後より筋負荷を開始した。移植 2 日後を 0 日目として 0、7、14、21、28 日目に筋力測定を実施した。28 日目にヒラメ筋を摘出し、組織学的

および免疫組織学的検討を行い、各群の筋線維径の比較や周囲組織の Myo-D 発現を観察した。

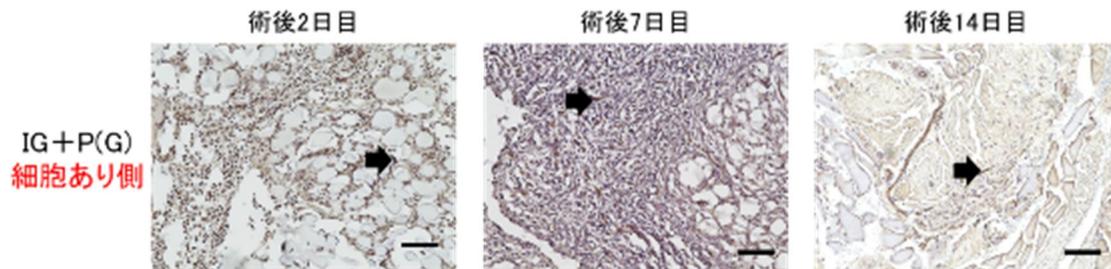
#### 4. 研究成果

##### (1) 各移植媒体を用いた幹細胞移植がラット咬筋組織に及ぼす影響

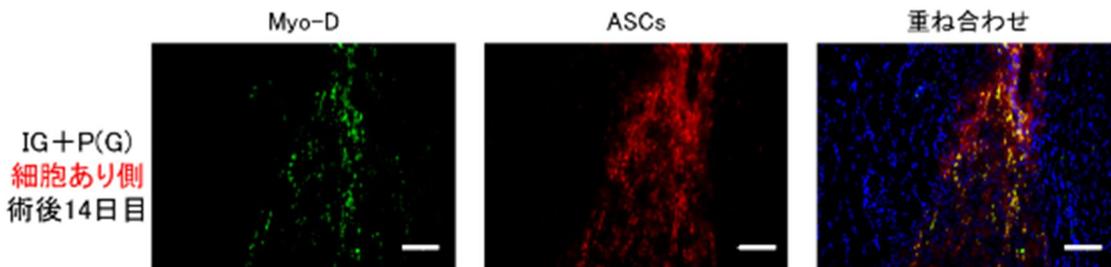
術後 2、7 日目では徐放粒子はまだ残存していたが、術後 14 日目で消失していた。術後 7 日目において IG+P(G) 群ではゲル注入部位周囲に一部空胞化した筋線維像を認めたが、術後 14 日目で改善傾向を示し、術後 28 日目では組織修復を認めた。



術後 2、7、14 日目において、移植した幹細胞が残存している周囲や、GF 徐放粒子の周囲に、血管内皮細胞のマーカである CD31 の発現を認めた。



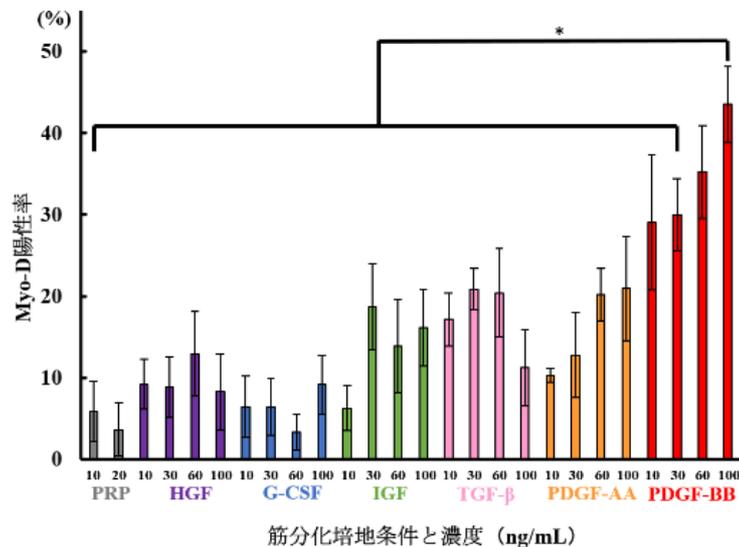
術後 14 日目で移植した ASCs の残存部位に、筋芽細胞のマーカである Myo-D の発現を認めた。



##### (2) ASCs の筋分化に有効な因子の検索

100 ng/ml PDGF-BB 群が最も高い Myo-D 陽性率を示し、他群に比べて有意に高値を示した。

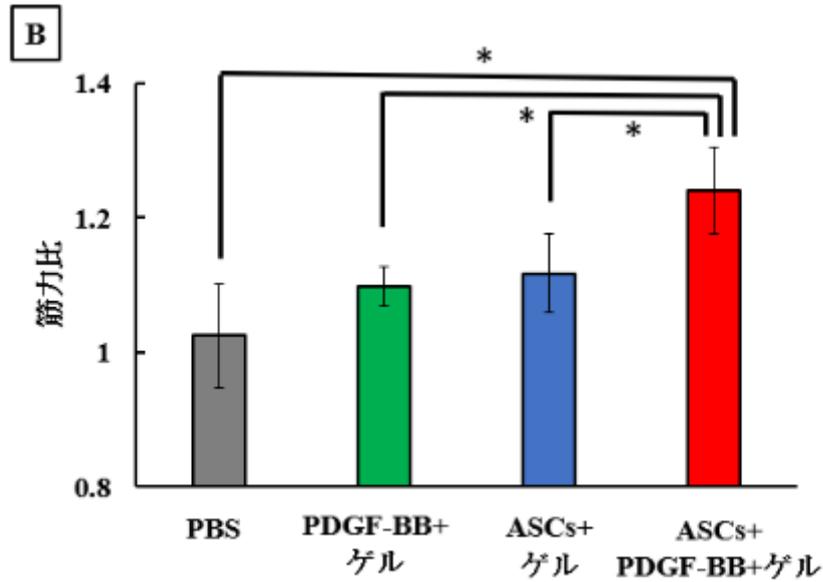
60 ng/ml PDGF-BB 群との間には有意差がみられなかった。



各群 n=6, p=0.37, Tukey-Kramer post hoc test

### (3) マウス筋組織への ASCs 移植による筋力増強に関する検証

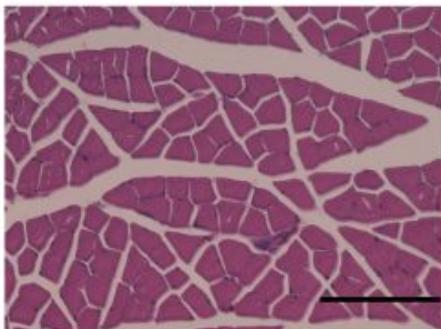
負荷開始 28 日目において ASCs+PDGF-BB+ゲル群が他群より有意に高値を示した。



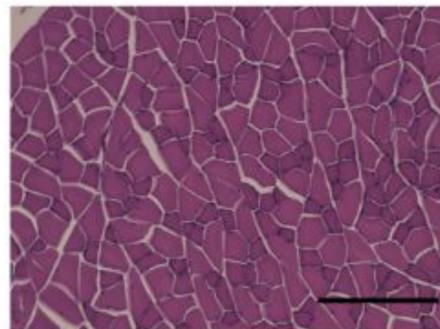
\* $p < 0.05$  (Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

#### 筋線維径の組織学的評価

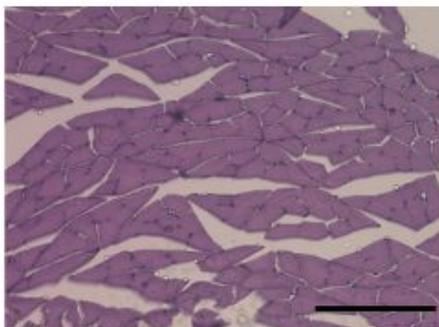
筋負荷群において各群の筋線維長径を比較した結果、ASCs+PDGF-BB+ゲル群が他群より有意に大きな値を示した。また、ハイドロゲルや細胞凝集体は組織切片にて観察できなかった。



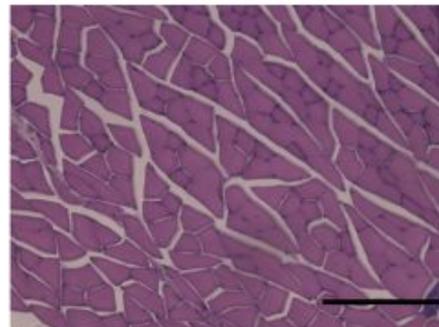
PBS



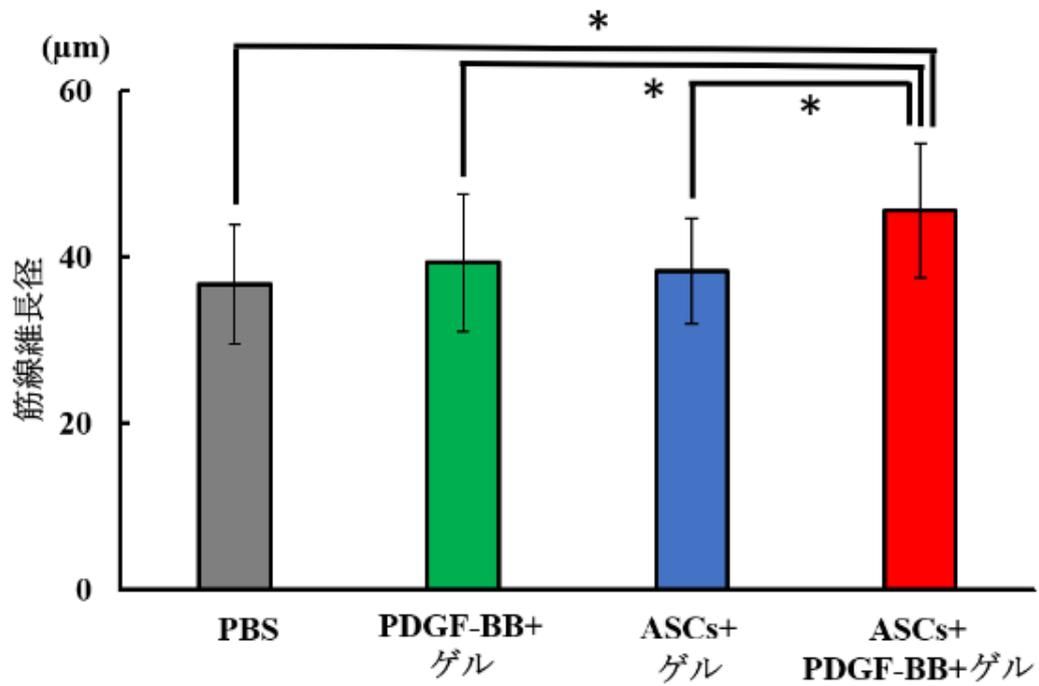
PDGF-BB+ゲル



ASCs+ゲル

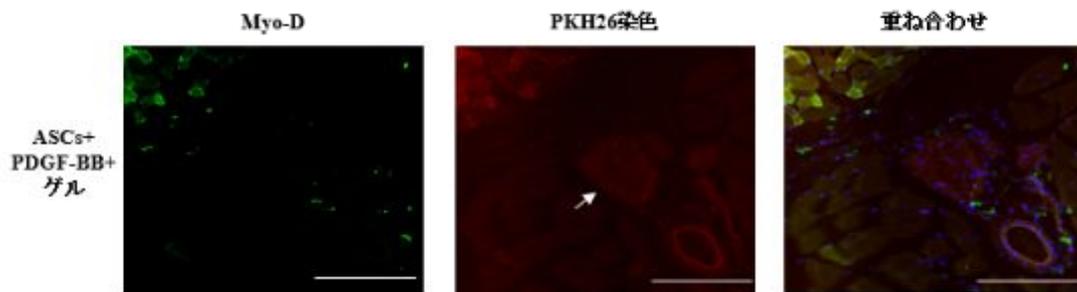


ASCs+PDGF-BB+ゲル



Bartlett test, single-factor ANOVA, Tukey Kramer 法)

ASCs+PDGF-BB+ゲル群では、移植した細胞凝集体そのものの周囲に Myo-D 発現を認めた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryo Mitsui a, b, Makoto Matsukawa a, Kiyoko Nakagawa a, Emiko Isomura a, Toshie Kuwahara b, Teruki Nii b, Susumu Tanaka a, Yasuhiko Tabata	4. 巻 18
2. 論文標題 Efficient cell transplantation combining injectable hydrogels with control release of growth factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 372 - 383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三ツ井 諒、磯村 恵美子、松川 誠、中川 記世子、古郷 幹彦
2. 発表標題 細胞増殖因子徐放粒子添加型インジェクタブルゲルによる効率的な幹細胞移植治療の確立
3. 学会等名 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------