

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17950

研究課題名（和文）新規FGF-2徐放性人工硬膜による脳挫傷保護治療の確立

研究課題名（英文）FGF-2 adsorbed artificial dura mater for protective treatment of cerebral contusion

研究代表者

伊藤 嘉朗 (Ito, Yoshiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90733014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：FGF-2吸着PGAの作製においてはプラズマ処理条件が0.5W/cm²が最も安定的にPGAにFGF-2を吸着させることができた。FGF-2吸着PGAは7日間はFGF-2が徐放され、FGF-2溶液濃度やPGAの枚数によって、徐放されるFGF-2を調整することができた。Cold induced brain injuryによる脳挫傷モデルに対してFGF-2吸着PGAの効果を検証した。脳挫傷作製直後にFGF-2吸着PGAを脳挫傷部位に直接留置したところ、14日目の組織学的評価では脳挫傷周囲に神経前駆細胞の増加とVEGF陽性細胞の増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳挫傷の一次脳損傷に対する治療法は確立されておらず、神経後遺症をきたす主な原因となっている。本研究では急性期にFGF-2吸着PGAを用いることで神経前駆細胞の増加を認めたことから、脳挫傷の一次脳損傷に対する新規治療法となりうる可能性がある。また脳挫傷以外の二次性脳障害に対しても神経機能回復としての新規治療として期待できる。

研究成果の概要（英文）：In the preparation of FGF-2 adsorbed PGA, 0.5 W/cm² plasma treatment was the most stable condition to adsorb FGF-2 on PGA. The amount of FGF-2 released could be adjusted by the concentration of FGF-2 solution and number of PGA sheets.

The effect of FGF-2 adsorbed PGA on a brain contusion model was examined. When FGF-2 adsorbed PGA was directly implanted at the site of brain contusion immediately after the creation of brain contusion, histological evaluation on day 14 showed an increase in neural progenitor cells and VEGF-positive cells around the brain contusion.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳挫傷 FGF-2 PGA FGF-2徐放システム

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

脳神経外傷は若年者の主な死因の一つで、重篤な後遺障害は死亡者数の 2-10 倍と推定されており、社会的損失は計り知れない。さらに最近では高齢化に伴い、転倒転落による頭部外傷が増加している。頭部外傷は一次性脳損傷と二次性脳損傷に分類され、一次性脳損傷は受傷時に脳組織が受ける器質的障害であり、二次性脳損傷は受傷後に付加的に加わる脳損傷である。現在の頭部外傷に対する治療としては、一次性脳損傷に対して直接的治療介入が難しいため、二次性脳損傷をいかに軽減できるかということに主眼が置かれている。二次性脳損傷の病態には細胞障害と血液脳関門の破綻による脳浮腫が関与しており、頭蓋内圧の制御が重要であるが、エビデンスのある治療法は少ない。過去には神経保護作用を企図した薬剤の研究が行われてきたが、臨床応用にまでは至っていない。新しい強力な治療法が求められている。

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)は 154 個のアミノ酸から成る分子量 18 kD の 1 本鎖ポリペプチドである。FGF-2 は血液脳関門の保護効果、血管新生、間葉系細胞や神経外胚系細胞の誘導などの作用を有し、脳梗塞や脳損傷に対する効果が報告されている。しかし、FGF-2 は生体内環境における安定性に乏しく、生物学的活性が 0.5 ~ 3 分ときわめて短いことが最大の欠点である。

人工硬膜素材の PGA 不織布はナノ連通多孔構造を有しておりプラズマ処理することで、PGA の表面正常が変化し、比較的少量の FGF-2 が吸着する。作製した FGF-2 吸着 PGA が体液環境下で FGF-2 が徐放する知見を得ている。FGF-2 は褥瘡治療薬として PGA は人工硬膜として臨床利用されていることから、実臨床に応用しやすい新規素材である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FGF-2 吸着 PGA という新規 FGF-2 徐放性人工硬膜を開発し、脳挫傷モデルにおける効果を明らかにすることである。

3. 研究の方法

FGF-2 吸着 PGA の作製(条件の検討)、FGF-2 の動態評価

本研究では、PGA 不織布のナノ構造、およびプラズマ処理・FGF-2 吸着条件が FGF-2 の吸着量・徐放動態に与える影響を明らかにし、
で用いる FGF-2 吸着 PGA の作製条件を検討する。

PGA 不織布に対し、種々の条件(電力密度、処理時間等)でプラズマ処理を施した後、低濃度から高濃度の FGF-2 溶液に PGA を浸し、液中 FGF-2 濃度を経時的に計測する。

さらに FGF-2 吸着 PGA からの FGF-2 徐放動態を評価するために、10%FBS 添加 DMEM 溶液に FGF-2 吸着 PGA を浸して、経時的に FGF-2 濃度を測定する。FGF-2 濃度の測定には FGF-2 測定 ELISA キットを使用する。

FGF-2 吸着 PGA の効果検証

脳挫傷モデルは、CD2 マウス(12w)を全身麻酔下に頭部を冠状切開して液体窒素で冷却した銅製プローブを経頭蓋的にあてて Cold induced brain injury (CIB)モデルを作製する。

本研究では、FGF-2 吸着 PGA の効果を検証する。の結果から FGF-2 吸着量によって 4 群に分けて、CIB モデルの頭蓋骨を削除して脳挫傷上に FGF-2 吸着 PGA を留置する。2 週後にモデルを安楽死させて、脳組織を摘出する。2mm ごとに冠状切片して、ホルマリン固定ののちヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)を行って、組織学的所見(脳挫傷体積と脳皮質アポトーシス)を評価する。評価結果をもとに
で用いる FGF-2 吸着 PGA を選定する。

CIB モデルにおける FGF-2 吸着 PGA の作用機序解明

本研究では CIB モデルにおける FGF-2 吸着 PGA の作用機序を明らかにする。コントロール群、PGA 単独群、FGF-2 吸着 PGA 群(2 群)に分けて、効果判定を試験する。機能評価はローターロッド試験、elevated body swing test を行う。組織学的評価は HE 染色、免疫染色(SMA 染色、Iba-1 染色、NeuN 染色)、蛍光免疫染色(VEGF、Factor VIII、GFAP)を行う。HE 染色では組織学的所見(脳挫傷体積、脳皮質アポトーシス)を検証する。免疫染色では血管新生の増生と神経細胞の損傷を検証する。蛍光免疫染色では、FGF-2 吸着 PGA の効果範囲を検証する。また real-time PCR で VEGF と COX-2 の発現を測定して、脳挫傷周囲、脳室上衣、皮質における効果を検証し、FGF-2 吸着 PGA の生化学的効果範囲を検証する。

4. 研究成果

FGF-2 吸着 PGA 作製

酸素プラズマの処理条件は 0.5 と 1.5W/cm² で行った。後者では素材の縮小をみとめた。また FGF-2 の吸着量は 1.5 のほうが多かったが、ばらつきが大きかった。以上より酸素プラズマ処理は 0.5W/cm² で行うこととした。

酸素プラズマ処理した PGA に FGF-2 を吸着させた。FGF-2 濃度や PGA の枚数を変更することで PGA に吸着する FGF-2 量が増加することが分かった。また徐放挙動実験では約 7 日間 FGF-2 が徐

放されることを確認した。

効果検証

CIB モデル作製後に開頭を行い、上記で作成した FGF-2 吸着 PGA を留置した。機能評価では FGF-2 吸着 PGA 群において有意な改善は認めなかった。組織学的評価では、脳挫傷周囲皮質に VEGF の発現と血管新生の増生を認めた。さらに脳挫傷周囲皮質に神経前駆細胞の増加を認めた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ito Yoshiro, Oyane Ayako, Yasunaga Mayu, Hirata Koji, Hirose Motohiro, Tsurushima Hideo, Ito Yuzuru, Matsumaru Yuji, Ishikawa Eiichi	4. 巻 110
2. 論文標題 Induction of angiogenesis and neural progenitor cells by basic fibroblast growth factor releasing polyglycolic acid sheet following focal cerebral infarction in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 1964 ~ 1975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.a.37434	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 伊藤嘉朗、大矢根綾子、荒木裕子、鶴嶋英夫、松丸祐司、石川栄一
2. 発表標題 脳梗塞モデルに対するFGF-2徐放性人工硬膜による神経前駆細胞の増加
3. 学会等名 STROKE2023
4. 発表年 2023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
研究協力者	大矢根 綾子 (Oyane Ayako)		
研究協力者	高橋 利英 (Takahashi Toshihide)		
研究協力者	荒木 裕子 (Araki Yuko)		

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
---------	---------