

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月21日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659236

研究課題名（和文）ペプチド系新規ハイドロゲルを利用した新規心筋梗塞治療システムの開発

研究課題名（英文）A novel injectable peptide-based hydrogel for myocardial infarction treatment

研究代表者

中谷 武嗣 (TAKESHI NAKATANI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・移植部・部長

研究者番号：6015752

研究成果の概要(和文):心筋梗塞に対するインジェクタブルゲル注入療法が注目されているが、梗塞部リモデリングの抑制のために最適なゲル化材料の特性は明らかとなっていない。ポリアルギン酸など非分解性のインジェクタブルハイドロゲルを心筋梗塞部位へ注入することで心機能が回復することが報告されているが、長期にわたって残留するこれらの材料が最適とは考えにくい。本プロジェクトでは、さらに、炎症性が小さくてかつ分解することにより長期炎症を回避できるゲルの開発と評価を進めた。低炎症性を期待して生体内に存在するタンパク質の高次構造を模倣した自己組織化ペプチドを検討し、さらには、 α ヒドロキシ酸を主成分とするインジェクタブルゲルも開発し、それらの、感温性およびゲル化挙動について詳細に検討するとともに、皮下埋入試験による炎症誘起性の評価とその治癒能力について検討した。

心筋梗塞モデルラットは、左冠動脈を結紮して作製した。結紮してから4週間後に心臓機能の指標である左室短縮率(%FS)を超音波エコー装置にて計測し、%FSが25%以下のものを心筋梗塞であると判断した。その後、30Gの注射針を用いて生分解性ハイドロゲルを心筋梗塞部位へ100 μ l注入した(n=4)。コントロール群としてアルギン酸ゲル(n=5)、または生理食塩水(n=5)を用いた。注入から4週間後に、%FSの測定ならびに摘出した心臓の組織学的評価により治療効果を検討した。生分解性ハイドロゲル注入群では、%FSは1か月間で、生理食塩水の場合と比較して有意に改善しており、開発した生分解性ハイドロゲルは梗塞部位への注入により心機能を有意に改善できる。さらに、炎症系細胞密度は、アルギン酸注入群より有意に減少しており、新たなハイドロゲル群は高い%FSの回復と低い炎症性が達成される有用なシステムであることが示唆された。

研究成果の概要(英文): Recently, injection of bio-derived hydrogels into myocardial infarction have been investigated for the novel treatment for left ventricular remodeling. In this study, a novel thermoresponsive peptide-type injectable gel matrix composed of naturally occurring sequences were developed, and their therapeutic efficiency was evaluated. A small peptide, Ac-(RVEIKVDI)₂-CONH₂ which mimics an anti-parallel β -sheet region of β 2-microglobulin, forms hydrogel in situ with high water content in 10% DMSO aqueous solution. Its solution formed hydrogel in approximately 3 minutes at room temperature. Hydrogelation of the peptide solution is driven by electrostatic and hydrophobic interaction with the conformational change from random coil to β -sheet structure, as assumed from FT-IR measurement. This hydrogel is rigid ($G' > 300$ Pa) and is not disrupted in PBS for over 24 hours. In addition, the peptide solution is easily injected into the body by syringe with thin needle, and the resultant hydrogel did not result in severe inflammation. This peptide hydrogel may have implication for in situ forming biomaterials. In addition, we confirmed that the injection of biodegradable hydrogel into the myocardial infarction is as effective as the previous non-degradable one may be via a different mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	2,800,000	510,000	3,310,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・外科学一般

キーワード： 人工臓器学・心筋梗塞・ゲル注入療法・ペプチドゲル・組織リモデリング

1. 研究開始当初の背景

カテーテル治療や冠動脈バイパス術、血栓溶解療法は心筋梗塞の急性期に対する治療法として選択されており、これらの進歩により心筋梗塞の救命率は向上した。しかしながら、心不全への移行期に起こる左室リモデリングに対する有効な治療法は未だ確立されていない。近年、その新たな治療法として、アルギン酸ゲルを梗塞部位へ直接注入することで、心室壁の増加により、左室リモデリングが抑制できると報告された (Landa N, et al. *Circulation*. 2008)。しかしアルギン酸塩は生体内に存在する酵素では分解されないことから、組織中での長期残存による慢性的な炎症を引き起こし (Alexander D. Augst, et al. *Macromol. Biosci*. 2006)、梗塞後期におけるリモデリングを進行させる可能性が指摘されている。

2. 研究の目的

上述のような背景から、一時的な左心室壁厚の維持と慢性炎症を惹起しない分解特性を併せ持つハイドロゲルを設計することで、左室リモデリングの効率的な抑制と心筋梗塞の有効な治療が達成できるものと考えた。本研究では、生体由来配列を有するペプチド-インジェクタブルハイドロゲルを設計した。ハイドロゲルはその高い含水率と構造特性ゆえに、細胞足場材料、細胞移植用担体や薬物徐放用担体などの生体材料として多用されている。近年、ペプチド・タンパク質の特異的な高次構造形成能を利用して分子間相互作用をコントロールし、非共有結合的架橋構造を形成させることによって構築される *in situ* ハイドロゲルの報告は数多く、局所投与型薬物徐放担体としての有用性に期待されている。これらの多くはβ-シート構造の凝集特性を利用したものであるが、生体内に存在しないアミノ酸配列を利用したものであるために、高い抗原性を示すことが懸念される。また、強い酸性もしくは塩基性のペプチド溶液を中和することによって起こる荷電性アミノ酸残基の解離状態の変化を利用して利用しているものが主であり、臨床への応用は容易ではない。そこで、生体内のあらゆる

細胞で産出されているβ2-ミクログロブリン構造中の逆平行βシート部分 (I35EID38/R80VK82)を模倣したペプチドよりなる生体親和性の高い *in situ* ハイドロゲルを開発した。

3. 研究の方法

Table1に示す4種類のβ2-ミクログロブリン模倣ペプチドをFmoc固相法によって合成後、種々溶媒に対する溶解性を検討してハイドロゲル形成に適した溶媒系を選定し、DMSO/水混合系において得られたハイドロゲルについて動的粘弾性を評価した。その後、最も安定したハイドロゲルを形成した Peptide-4 (Ac-(RVEIKVDI)₂-CONH₂)ハイドロゲルをマウス皮下へ注入し、継時的に組織学的評価を行うことによってその生体親和性および生体内分解吸収性を評価した。ハイドロゲルをマウス皮下へ投与し、その炎症性について詳細に検討した。

心筋梗塞モデルラットは、左冠動脈を結紮

Table 1. Property of β₂-microglobulin mimicked peptides in 10%-DMSO/H₂O solution.

#	Sequence	Property of 10% DMSO solution (Peptide conc.; 1 w/v%)
1	Ac-(RVVDI) ₄ -CONH ₂	Precipitation
2	Ac-(RVEI) ₄ -CONH ₂	Precipitation
3	Ac-(RVKVEIDI) ₂ -CONH ₂	Gelation
4	Ac-(RVEIKVDI) ₂ -CONH ₂	Gelation

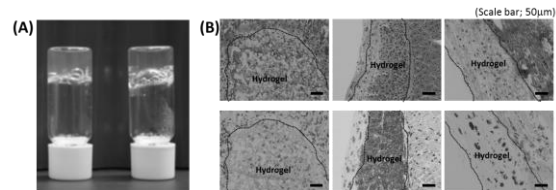


Fig. 1 Properties of Peptide hydrogels. (A) Hydrogels of peptide-3(left) and peptide-4 (right) in 10% DMSO/H₂O at 1.0 v/v%. (B) Biocompatibility of peptide-4 hydrogel in mice 1, 7 and 21 days after injection. Histological evaluation was carried out by HE staining (top) and F4/80 immunostaining (bottom).

して作製した。結紮してから4週間後に心臓機能の指標である左室短縮率 (%FS) を超音波エコー装置にて計測し、%FSが25%以下のものを心筋梗塞であると判断した。その後、30Gの注射針を用いて生分解性ハイドロゲル

を心筋梗塞部位へ100 μ l注入した(n=4)。コントロール群としてアルギン酸ゲル(n=5)、または生理食塩水(n=5)を用いた。注入から4週間後に、%FSの測定ならびに摘出した心臓の組織学的評価により治療効果を検討した。

4. 研究成果

Fmoc固相法によって合成したPeptide 1~4の種々溶媒に対する溶解性を評価したところ、Peptide 3および4はDMSOに易溶であり、かつ10%-DMSO/水混合系において低濃度(1.0 w/v%)で流動性のないハイドロゲルを形成した(Table 1, Fig. 1(a))。これらハイドロゲルの強度はそれぞれ318Paおよび407Paであった。DMSOは、血管塞栓剤の溶媒などとして臨床応用されていることから、本ハイドロゲルは臨床でも利用可能であると考えられる。そこで、Peptide-4ハイドロゲルをマウス皮下に注入して経時的に組織学的評価を行ったところ、重篤な血管新生などの初期炎症は認められず、時間の経過に伴ってマクロファージがゲル内に浸潤し分解されていく様子を確認することができた(Fig. 1 (B))。

一方、 α ヒドロキシ酸よりなる感温性ハイドロゲルに関しては、GPC測定の結果から作製したポリマーの平均分子量が、疎水性部と親水性部がそれぞれ3100Da、5200Daであった。37 $^{\circ}$ Cの条件において貯蔵弾性率(G')と損失弾性率(G'')の交点は約2分であり、 G' は2.1kPaを示した。この結果より、合成したインジェクタブルゲルは、生理的条件下で29 $^{\circ}$ Cを転移温度として迅速にハイドロゲルを形成することが実証された。

次に、生分解性ハイドロゲルを心筋梗塞モデルラットへ注入した結果、%FSは1か月間で1.1%回復し20.8%を示した。この値は生理食塩水の場合と比較して有意に改善しており、アルギン酸の場合と同程度であった。つまり、作製したハイドロゲルは梗塞部位への注入により心機能を有意に改善できることが明らかとなった。また、ハイドロゲルを注入してから1か月後における心室壁厚は、アルギン酸移植群と比較して増加していなかった。また、マクロファージの集積をCD68免疫染色により検討したところアルギン酸注入群では多数のマクロファージが心室壁内部で観察されたのに対してハイドロゲルを注入した群においてその半分程度であった。以上の結果より、アルギン酸ゲルを移植した場合には、%FSの回復が示される一方で長期にわたるマクロファージの集積による炎症反応を惹起する可能性が示唆された。さらに、生分解性ハイドロゲルは%FSの回復と同時に移植後1ヶ月において炎症反応を抑制しているものと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- 1) J-H. Seo, Designing dynamic surfaces for regulation of biological responses. *Soft Matter*, 査読有, 8, 2012, 5477-5485 DOI: 10.1039/c2sm25318f
- 2) Toda K, Nakatani T, et al., Late aortic insufficiency related to poor prognosis during left ventricular assist device support. *Ann Thorac Surg*, 査読有, 92, 2011, 929-934 DOI:10.1016/j.athoracsur.2011.04.115
- 3) Yamazaki S.MD, Nakatani T, et al., Activated protein C attenuates cardiopulmonary bypass-induced acute lung injury through the regulation of neutrophil activation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 査読有, 141(5), 2011, 1246-1252 DOI: 10.1016/j.jtcvs.2010.05.043
- 4) Kitamura S, Nakatani T, et al., Mid-to long-term outcomes of cardiovascular tissue replacements utilizing homografts harvested and stored at Japanese Institutional tissue banks. *Surg Today*, 査読有, 41, 2011, 500-509 DOI: 10.1007/s00595-010-4459-x
- 5) S. Kakinoki, Surface modification of poly(L-lactic acid) nanofiber with oligo(D-lactic acid)-bioactive-peptide conjugates for peripheral nerve regeneration. *Polymers*, 査読有, 3, 2011, 820-832 DOI: 10.3390/polym3020820
- 6) 中谷武嗣、心臓移植、循環器疾患最新の治療 2010-2011、査読無、2010、279-282
- 7) 築瀬正伸、中谷武嗣、心臓移植交代関連拒絶反応の診断と治療、心臓、査読無、42巻、2010、20-25
- 8) 土井洋平、吉原史樹、中村敏子、小川浩司、井口公平、植田初江、屋宜宣仁、堀尾武史、岩嶋義雄、林 輝行、中谷武嗣、大塚頼隆、河野雄平、拡張型心筋症による心原性ショック、多臓器不全に対し急性血液浄化法を施行し補助人工心臓装着に至った1例、透析会誌、査読有、43巻、2010、847-851

[学会発表] (計21件)

- 1) 柿木佐知朗、構造の異なる親水性高分子鎖で修飾されたマテリアル界面に対する血小板応答、第33回日本バイオマテリアル学会大会、2011/11/22、京都テルサ
- 2) 柿木佐知朗、種々の表面をもつ多孔質スキャホールドの移植によって引起される炎症反応の遺伝子網羅解析、第33回

- 日本バイオマテリアル学会大会、2011/11/21、京都テルサ
- 3) 中谷武嗣、戸田宏一、他。改正臓器移植法下における心臓移植実施の現状と問題点、第47回日本移植学会総会、2011/10/5、仙台国際センター
 - 4) 柿木佐知朗、高分子多孔体の移植による炎症反応の遺伝子網羅解析、第60回高分子討論会、2011/9/30、岡山大学 津島キャンパス
 - 5) 柿木佐知朗、Platelet response to PEG-grafted biomaterial surfaces with different chain length and molecular architecture, 3th Asia Biomaterial Congress, 2011/9/15, BEXCO Busan
 - 6) 柿木佐知朗、ラミニン由来配列を有する感温性エラスチン様人工タンパク質によって機能化されたポリ乳酸ナノファイバー神経誘導管の作製、平成23年度繊維学会秋季研究発表会、2011/9/8、徳島文理大学香川キャンパス
 - 7) 柿木佐知朗、多孔質スキャホールドの移植が引起す炎症反応の遺伝子チップを用いた網羅解析、日本バイオマテリアル学会 第6回関西若手研究発表会、2011/8/12、国立循環器病研究センター
 - 8) 柿木佐知朗、分子形態の異なる親水性界面に対する血小板応答、第40回医用高分子シンポジウム、2011/7/26、関西大学千里山キャンパス100周年記念館ホール1
 - 9) 柿木佐知朗、生体親和性ペプチド水ゲルの徐放型アンチセンス療法への展開、第21回バイオ・高分子シンポジウム、2011/7/26、関西大学千里山キャンパス100周年記念館ホール2
 - 10) 柿木佐知朗、温度転移型人工細胞外基質によるポリ乳酸ナノファイバー神経誘導管の機能化、平成23年度繊維学会年次大会、2011/6/8、タワーホール船堀
 - 11) 柿木佐知朗、移植された高分子材料が引き起こす生体応答の発現遺伝子網羅解析、平成23年度繊維学会年次大会、2011/6/8、タワーホール船堀
 - 12) Nakatani T, Changes in healthcare reform in Asia. ASAI0 56th Annual Conference, 2011/5/27, Baltimore, U.S.A
 - 13) 柿木佐知朗, Global gene expression analysis of biological responses for porous polymer scaffolds with different molecular architecture, 第60回高分子学会年次大会, 2011/5/25, 大阪国際会議場
 - 14) 柿木佐知朗, Thermo-responsive artificial extracellular matrix protein for nerve regeneration,

- Society For Biomaterials 2011, 2011/4/14・15, Disney's Contemporary Resort
- 15) 柿木佐知朗, Platelet response to PEG-modified surface with different molecular architecture, Society For Biomaterials 2011, 2011/4/14・15, Disney's Contemporary Resort
 - 16) 段 孝彰, P19CL6 細胞の心筋分化誘導に与える細胞外マトリックスタンパク質の影響、日本化学会第91春季年会、2011/3/11、講演予稿集
 - 17) 山下 敦, P19CL6 細胞の心筋分化誘導における培養基質表面特性の影響、第10回日本再生医療学会総会、2011/3/1、東京
 - 18) 柿木佐知朗、b2-ミクログロブリン模倣型ペプチド水ゲルの薬物徐放担体としての展開、第32回日本バイオマテリアル学会大会、2010/11/30、広島
 - 19) 辛 昊俊、エステル含有ポリロタキサン架橋水ゲルの加水分解過程における特性の解析、第39回医用高分子シンポジウム、2010/7/27、東京
 - 20) 柿木佐知朗、 β -シート型 In situ ペプチド水ゲルの設計とその評価、第59回高分子学会年次大会、2010/5/28、横浜
 - 21) 馬原 淳、心筋組織の再生を目指したペプチドゲルマトリックスの創成、第39回医用高分子シンポジウム、2010/7/27、東京

〔図書〕(計2件)

- 1) 中谷武嗣、シュプリンガー・ジャパン株式会社、心臓移植、2011、5(372-376)
- 2) 中谷武嗣、中山書店、循環器臨床 サピア 8 心不全の急性期対応、2010、8(194-201)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 武嗣 (NAKATANI TAKESHI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・移植部・部長
研究者番号：60155752

(2) 研究分担者

山岡 哲二 (YAMAOKA TETSUJI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・生体医工学部・部長
研究者番号：50243126