

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410232

研究課題名(和文) 不織布と細胞との相互作用による腎臓再生デバイスの創製

研究課題名(英文) Creation of a novel device for renal regeneration by the interaction of a nonwoven filters and cells.

研究代表者

堀 秀生 (HORI, Hideo)

藤田保健衛生大学・保健学研究科・講師

研究者番号：00342113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞と不織布の相互作用を利用した腎臓再生デバイスを創製し、慢性腎不全モデルラットに対する治療効果を検討した。

1. 不織布の繊維径を3 $\mu$ m以下にし、積層枚数を増やすことで細胞を高効率に細胞を捕捉することができた。適切な不織布素材に捕捉された細胞と不織布素材の相互作用により、成長因子の産生が促進された。

2. ラット骨髄由来間葉系幹細胞捕捉ポリ乳酸製不織布を慢性腎不全ラットの腎臓へ貼付することにより、糸球体硬化病変の抑制作用が確認された。この効果はデバイスより放出された肝細胞増殖因子であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the design of the cell capturing device, growth factor production by the cells on nonwoven filters, and therapeutic effect of cells capturing nonwoven filters on a rat model of chronic renal failure.

1. The Nonwoven filters diameter less than 3  $\mu$ m and the number of filter disks were necessary to capture Cells at high rates. The production of growth factor was significantly enhanced by the interaction with nonwoven filters. These enhancements varied with the combination of the nonwoven filter and cells.

2. Rat mesenchymal stem cells on nonwoven filters provide enhanced hepatocyte growth factor production and reduced glomerulosclerotic lesions in a model of chronic renal failure.

研究分野：医薬医療分野(医療機器、再生医療、血液浄化)

キーワード：再生医療 不織布 腎臓 幹細胞 成長因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 本応募者は、よりよい血液透析をめざして、人工透析のトータルシステムの改良について研究を行ってきた。しかしながら、血液透析を行う限り大幅な QOL の改善は難しいため、透析回避・離脱を実現できる治療デバイスの創製を目指している。

(2) 研究分担者の北口らは生分解性不織布のポリ乳酸 (PLA) に、自己末梢血中の白血球および血小板を濾過吸着させ、創傷部位に貼付することで、他の素材の不織布にはない治癒促進効果をマウスで見出した。

(3) PLA 製不織布とポリエチレンテレフタレート (PET) 製不織布を入手し、ヒト末梢血細胞を捕捉する不織布デバイスを検討してきた。その結果、不織布素材で捕捉率が異なること、繊維径を 3 $\mu\text{m}$  以下にして、かつ、積層枚数を増やすことで、ヒト末梢血細胞を高効率に捕捉することを見出した。また、ヒト間葉系幹細胞においても、85%以上と高効率に捕捉することも確認でき、様々なヒト由来細胞を捕捉することが可能であった。

(4) ヒト末梢血細胞およびヒト脂肪由来間葉系幹細胞を捕捉した不織布 (PET、PLA) を培養すると腎臓再生関連成長因子の一つである血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生が材料依存性に亢進することを確認した。

2. 研究の目的

本研究の最終目的：不織布に捕捉された細胞との相互作用により腎臓を再生・修復する腎臓再生デバイスの創製を目指す (図 1)。最終的には腎不全患者の人工透析回避・離脱を目指す。

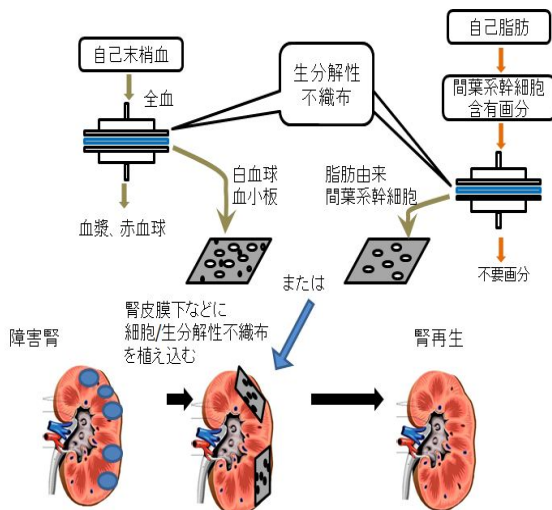


図 1. 細胞と不織布の相互作用を利用した腎臓再生デバイスの概念図

本応募では

(1) 不織布素材、繊維径、積層枚数、形状などを検討し、不織布に捕捉された細胞から

放出される成長因子、サイトカイン類の産生能が亢進する細胞捕捉不織布デバイスを構築する。

(2) 内視鏡など低侵襲治療に適した方法で、細胞捕捉不織布と腎臓を接触させ、慢性腎不全モデル動物を用いて治療効果を確認する。

3. 研究の方法

(1) 腎臓再生デバイスの構築

細胞捕捉不織布デバイスの構築

繊維径、繊維密度、素材の異なる不織布を用いた。各不織布の物性値を表 1 に示す。各不織布を積層し、濾過滅菌用フィルタを用いて末梢血細胞、あるいは間葉系幹細胞を濾過し、濾過前後の細胞数を計測し、細胞捕捉率を算出した (図 2)。

表 1. 検討した不織布の物性値

不織布素材	繊維径 ( $\mu\text{m}$ )	繊維密度 ( $\text{g}/\text{m}^2$ )
PET	1.2	40
PLA	1.8	33
PLA	3	66
PLA	18-22	30
PLA	18-22	70
PLA	18-22	150
キチン	8	30

PET: ポリエチレンテレフタレート (旭化成 せんい)

PLA: ポリ乳酸 (旭化成 せんい)

キチン: ベスキチン (ユニチカ)

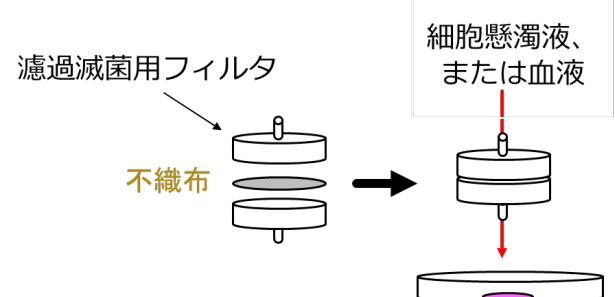


図 2. 細胞捕捉不織布デバイス

細胞と不織布粉体との混合物の構築

PLA、PET 製不織布を冷凍粉碎機 (吉田製作) にて粉碎した。粉体は Cell Sens Standard (オリンパス) を用いて投影面積を計測した。粉体は細胞懸濁液と混和し、混合物とした。混合物は注射器によって投与可能であるが腎臓被膜下への投与実験も行った。

(2) 細胞捕捉不織布デバイスの成長因子産生能

不織布素材

PLA (繊維径 1.8 $\mu\text{m}$ )、PET (繊維径 1.2 $\mu\text{m}$ ) を用いた。

細胞

ヒト末梢血細胞 (h-PBC)、マウス末梢血細胞 (m-PBC)、ラット末梢血細胞 (r-PBC)、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (h-ASC、Lonza)

ラット骨髄由来間葉系幹細胞 ( r-BMSC、Lonza )、ラット脂肪由来間葉系幹細胞 ( r-ASC、Cyagen ) を評価した。

#### 成長因子産生能の評価法

細胞懸濁液 (  $8 \times 10^4$  cells/mL )、あるいは末梢血 1mL を不織布に濾過し ( 図 2 )、細胞を捕捉した不織布をシャーレ上で培養し、培養液中の血管内皮細胞増殖因子 ( VEGF )、肝細胞増殖因子 ( HGF )、塩基性線維芽細胞増殖因子 ( FGF2 )、ケラチノサイト増殖因子 ( FGF7 )、血小板由来成長因子 ( PDGF-AB )、トランスフォーミング増殖因子 ( TGF-  $\beta$  1 ) を測定した。細胞のみ培養したものあるいは、血漿をコントロールとした。

#### (3) 細胞と不織布粉体との混合物の成長因子産生能

##### 不織布素材

PLA ( 繊維径 1.8 $\mu$ m )、PET ( 繊維径 1.2 $\mu$ m ) 製不織布を冷凍粉碎機にて作成した粉体を用いた。

##### 細胞

細胞は r-BMSC、r-ASC を評価した。

##### 成長因子産生能の評価

細胞  $10^4$  cells に対して不織布粉体を 0.25、0.5、1.0、1.5mg 混和し、細胞のみを培養したものをコントロールとした。不織布粉体/細胞の混合物を培養し、培養上清中の VEGF、HGF を測定した。

#### (4) 腎臓再生デバイスの治療効果

##### 慢性腎不全モデル動物

糸球体障害モデルとして 5/6 腎臓摘出ラット ( 日本チャールスリバー )、尿管・間質障害モデルとしてアデニン誘発慢性腎不全ラット ( アデニンラット ) を用いた。アデニンラットは 0.75% アデニン含有飼料を 10 週齢の SD ラット ( オス、日本チャールスリバー ) に 4 週間自由摂取させて作成した。

##### 細胞捕捉不織布デバイス

成長因子産生能の評価にて成長因子の産生が亢進された r-BMSC 捕捉 PLA 不織布デバイスと r-PBC 捕捉 PET 不織布デバイスの治療効果を評価した。図 2 に示すように、r-BMSC 懸濁液 (  $3 \times 10^5$  cells )、ラット血液は 5mL を濾過し、デバイスを作製した。

デバイスは、慢性腎不全モデルラットの腎臓被膜を剥離して貼付した。

##### 細胞と不織布粉体との混合物

成長因子産生能の評価にて成長因子の産生が亢進された PLA 不織布粉体/r-BMSC の混合物の治療効果を評価した。

細胞懸濁液 (  $10^4$  cells ) と PLA 不織布粉体を混和した。混合物を遠心し、上清を吸引後、コラーゲン ( 200 $\mu$ L、新田ゼラチン ) と混和しゲル化した後、慢性腎不全モデルラットの腎臓被膜下へデバイスを留置した。

##### 腎機能評価法

デバイス埋め込み手術後、血清クレアチニン、尿蛋白を測定し、未治療の慢性腎不全モデルラットをコントロールとして治療効果を評価した。

#### (5) 統計

JMP10 ( SAS Institute ) を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 腎臓再生デバイスの構築

###### 細胞捕捉不織布デバイス

ヒト細胞と同様に不織布の繊維径を 3 $\mu$ m 以下にして、かつ積層枚数を増やすことで、ラットおよびマウス末梢血細胞やラット間葉系幹細胞を高効率に捕捉することを確認した。また、走査型電子顕微鏡下 ( HITACHI ) で不織布に細胞が自ら接着している様子が観察された ( 図 3 )。

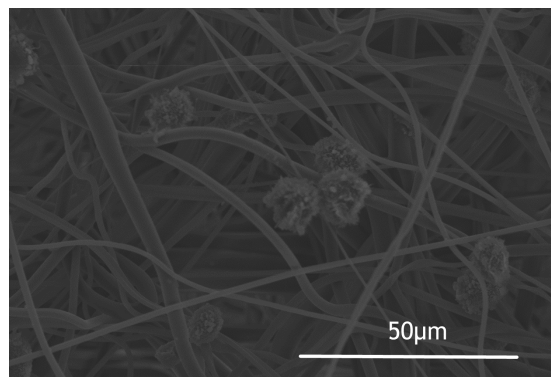


図 3 . r-BMSC を捕捉した PLA 不織布

###### 細胞と不織布粉体との混合物

不織布を冷凍粉碎機で粉碎した結果、PLA は  $201.1 \pm 380.2 \mu\text{m}^2$ 、PET は  $371.5 \pm 2227.2 \mu\text{m}^2$  の粒子面積をもつ不織布粉体が得られた。走査型電子顕微鏡下で粉体に細胞が接着している様子が観察された ( 図 4 )。この混合物 ( 液状 ) を注射器で腎臓被膜下へ投与したところ、混合物が腎臓から流出したため、コラーゲンでゲル化した後に留置した。

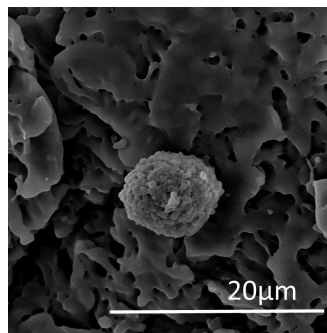


図 4 . r-BMSC を捕捉した PLA 不織布粉体

##### (2) ヒト由来細胞捕捉不織布デバイスの成長因子産生能

細胞と不織布素材の組合せにより成長因

子の産生能は異なった。コントロール群と比較して h-PBC 捕捉 PET 不織布デバイスおよび h-PBC 捕捉 PLA 不織布デバイスは VEGF、PDGF-AB、TGF- 1 の産生が亢進し（表 2）、h-ASC 捕捉 PLA 不織布デバイスでは、VEGF の産生が亢進した（表 3）。h-BMSC 捕捉不織布デバイスでは、成長因子の産生亢進が確認できなかった（表 4）。

表 2 . h-PBC 捕捉不織布デバイスにおける成長因子産生能

成長因子	PET 不織布	PLA 不織布
VEGF		
HGF		
FGF2		
FGF7		
PDGF-AB		
TGF- 1		

: 産生亢進 : 産生抑制 -: 同程度

表 3 . h-ASC 捕捉不織布デバイスにおける成長因子産生能

成長因子	PET 不織布	PLA 不織布
VEGF		
HGF		
FGF2		
FGF7		
PDGF-AB		
TGF- 1		

: 産生亢進 : 産生抑制 -: 同程度

表 4 . h-BMSC 捕捉不織布デバイスにおける成長因子産生能

成長因子	PET 不織布	PLA 不織布
VEGF		
HGF		

: 産生亢進 : 産生抑制 -: 同程度

(3) マウス由来細胞捕捉不織布デバイスの成長因子産生能

細胞と不織布素材の組合せにより成長因子の産生能は異なった。コントロール群と比較して m-PBC 捕捉 PET 不織布デバイスは PDGF-AB、TGF- 1 の産生が亢進し、m-PBC 捕捉 PLA 不織布デバイスでは、FGF7、TGF- 1 の産生が亢進した（表 5）。

表 5 . m-PBC 捕捉不織布デバイスにおける成長因子産生能

成長因子	PET 不織布	PLA 不織布
VEGF		
FGF2		
FGF7	-	
PDGF-AB		-
TGF- 1		

: 産生亢進 : 産生抑制 -: 同程度

(4) ラット由来細胞における腎臓再生デバイスの成長因子産生能

細胞捕捉不織布デバイス

細胞と不織布素材の組合せにより成長因子の産生能は異なった。コントロール群と比較して r-PBC 捕捉 PET 不織布デバイスは VEGF の産生が亢進し（表 6）、r-PBC 捕捉 PET 不織布デバイスと r-BMSC 捕捉 PLA 不織布デバイスでは HGF の産生が亢進した（表 7）。

表 6 . 細胞種と不織布素材の違いによる VEGF 産生能の比較

細胞	PET 不織布	PLA 不織布
r-PBC		
r-BMSC		
r-ASC		-

: 産生亢進 : 産生抑制 -: 同程度

表 7 . 細胞種と不織布素材の違いによる HGF 産生能の比較

細胞	PET 不織布	PLA 不織布
r-PBC		-
r-BMSC	-	
r-ASC		-

: 産生亢進 : 産生抑制 -: 同程度

不織布粉体と細胞との混合物

細胞と不織布粉体素材の組合せにより成長因子の産生能は異なった。コントロール群と比較して PLA 不織布粉体/r-BMSC との混合物は VEGF の産生が亢進し（表 8）、PET 不織布粉体/r-ASC との混合物では HGF が亢進した（表 9）。

細胞密度と不織布粉体量に最適比があることが分かり、不織布粉体量が多い場合には成長因子の産生能は抑制された（図 5）。

新しい素材として天然高分子であるキチン、キトサン（和光）と細胞との混合物の検討も開始した。

表 8 . 細胞種と不織布粉体素材の違いによる VEGF 産生能の比較

細胞	PET 不織布粉体	PLA 不織布粉体
r-BMSC		
r-ASC	-	-

: 産生亢進 : 産生抑制 -: 同程度

表 9 . 細胞種と不織布粉体素材の違いによる HGF 産生能の比較

細胞	PET 不織布粉体	PLA 不織布粉体
r-BMSC	-	-
r-ASC		-

: 産生亢進 : 産生抑制 -: 同程度

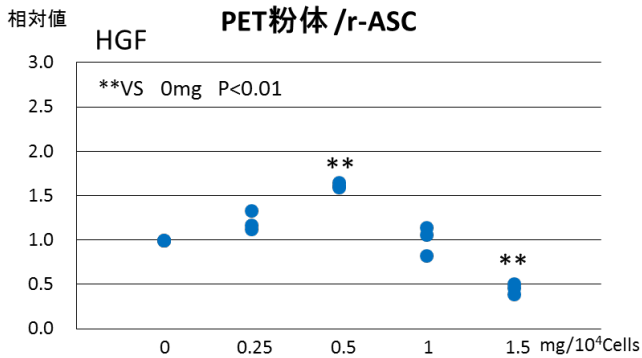
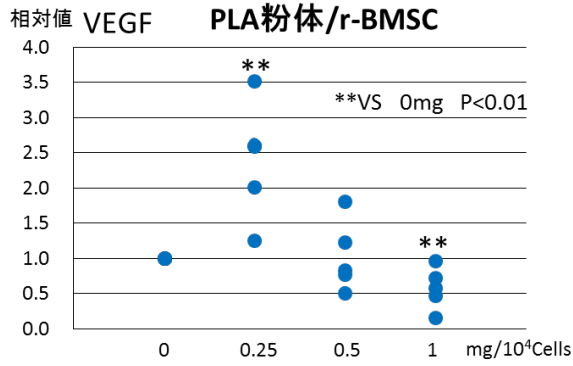


図5 . 不織布粉体量の違いによる成長因子産生能

(2) 腎臓再生デバイスの治療効果

5/6 腎臓摘出ラットに対する r-PBC 捕捉 PET 不織布デバイスの治療効果

デバイス留置手術後 13 週以降で、未治療群 (Untreated) と比較して PET 不織布のみの貼付 (PET)、r-PBC 捕捉 PET 不織布群 (PBMC/PET) において尿蛋白、血清クレアチニンで有意差は認められなかったが低値傾向を示した (図6)。しかしながら、術後 3 日以内に、PET 群で 3 匹、PBMC/PET 群で 1 匹が死亡したため PET 不織布による急性の炎症反応が示唆された。

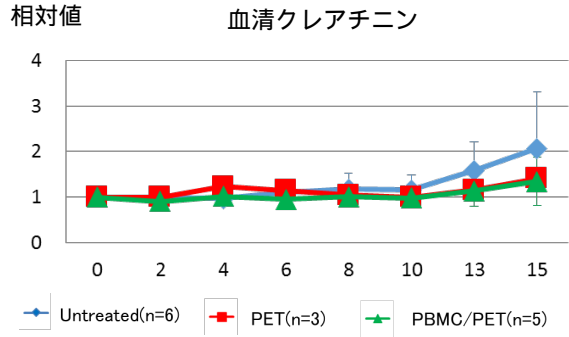
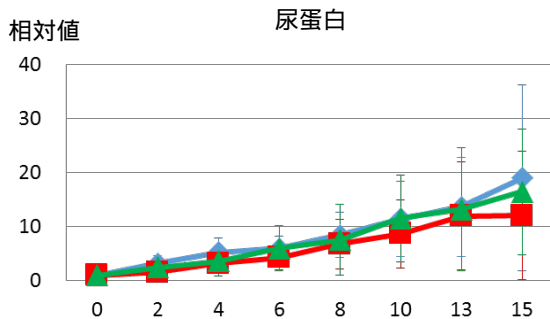


図6 . 尿蛋白と血清クレアチニンの経時変化

5/6 腎臓摘出ラットに対する r-BMSC 捕捉 PLA 不織布デバイスの治療効果

デバイス留置手術後 4 週目で、r-BMSC 捕捉 PLA 不織布群 (r-BMSC/PLA-1) は未治療群 (Control) と比較して、尿蛋白が有意に低値を示した (図7)。病理学的評価においては、治療群と比較して糸球体硬化様病変の発生率が未治療群に比し有意に低値を示した。

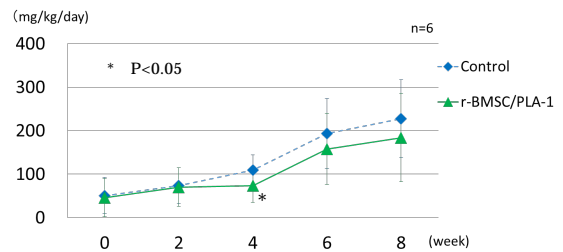
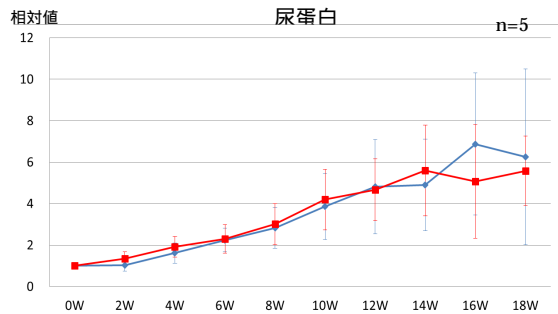


図7 . 尿蛋白量の経時変化

5/6 腎臓摘出ラットに対する r-BMSC と PLA 不織布粉体との混合物による治療効果

デバイス留置手術後 14 週あるいは 16 週以降で、治療群は未治療群 (コントロール) と比較して、血清クレアチニン、尿蛋白で低値傾向を示したが有意差はなかった (図8)。デバイスの治療効果が弱いと考えられたため、細胞数を増やすなどの改善が必要と考えられた。



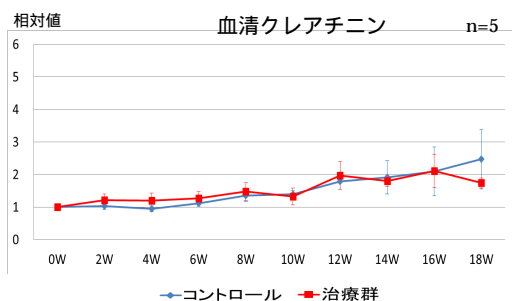


図8. 尿蛋白と血清クレアチニンの経時変化

アデニンラットに対する r-BMSC と PLA 不織布粉体との混合物の治療効果

アデニン投与開始と同時にデバイスを腎臓被膜下へ留置した。しかしながら治療効果は確認できなかった。血清クレアチニンの上昇率が5/6腎臓摘出ラットと比較して著しかったため、障害が強すぎると考えられた。そこで、アデニンを4週間投与後、通常飼料に変更した。アデニン投与を中止してからデバイスを腎臓被膜下へ留置した。その結果、尿蛋白と血清クレアチニンに改善傾向はみられたが有意差はなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

U Iwamoto, H Hori, Y Takami, Y Tokushima, M Shinzato, M Yasutake, N Kitaguchi. A novel cell-containing device for regenerative medicine: biodegradable nonwoven filters with peripheral blood cells promote wound healing. J Artif Organs. 査読有、2015;18:315-321

H Hori, U Iwamoto, G Niimi, M Shinzato, Y Hiki, Y Tokushima, K Kawaguchi, A Ohashi, S Nakai, M Yasutake, N Kitaguchi. Appropriate nonwoven filters effectively capture human peripheral blood cells and mesenchymal stem cells, which show enhanced production of growth factors. 査読有、2015;18:55-63

[学会発表](計 4件)

堀秀生、兼子結衣、大野朱香、佐藤綾乃、中谷友樹、新美元、比企能之、北口暢哉、組織再生促進デバイス:細胞と不織布粉体との混合物による成長因子産生能の検討、第53回日本人工臓器学会大会、2015年11月21日、東京

H Hori, M Shinzato, K Kawaguchi, A Ohashi, S Nakai, S Nagao, Y Hiki, N Kitaguchi. THERAPEUTIC EFFECT OF NONWOVEN BIODEGRADABLE FILTERS WITH MESENCHYMAL STEM

CELLS ON A RAT MODEL OF CHRONIC RENAL FAILURE. 41st Annual ESAO Congress. 2014年9月18日 ローマ

北口暢哉、堀秀生、生分解性不織布を足場材料とする再生医療デバイス~腎再生を目指して~、中部地区医療・バイオ系シーズ発表会、2013年12月12日、名古屋

Hideo Hori, Masanori Shinzato, Taiga Ishida, Emi Takase, Kazunori Kawaguchi, Atsushi Ohashi, Shigeru Nakai, Shizuko Nagao, Yoshiyuki Hiki, Nobuya Kitaguchi. Therapeutic effect of nonwoven polyesterfilters with/without peripheral-blood cells on a rat model of chronic renal failure. 5th Congress of the International Federation for Artificial Organs. 2013年9月27日 横浜

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称:組織修復及び/又は再生促進剤

発明者:北口暢哉、堀秀生

権利者:学校法人藤田学園

種類:特許

番号:特願 2013-256119

出願年月日:2013年12月11日

国内外の別:国内

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

堀 秀生 (HORI, Hideo)

藤田保健衛生大学・医療科学部・講師

研究者番号:00342113

##### (2)研究分担者

比企能之 (HIKI, Yoshiyuki)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授

研究者番号:20156566

北口暢哉 (KITAGUCHI, Nobuya)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授

研究者番号:70508077

新里昌功 (SHINZATO, Masanori)

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授

研究者番号:80148288

##### (3)連携研究者:なし

##### (4)主な研究協力者

長尾静子 (NAGAO, Shizuko)

藤田保健衛生大学・疾患モデル教育研究センター・教授

新美元 (NIIMI, Gen)

藤田保健衛生大学・共同利用研究施設・講師