

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26670623

研究課題名(和文) 温度応答性ポリ乳酸ハイドロゲルを利用した心筋梗塞治療システムの開発

研究課題名(英文) Treatment of rat myocardial infarction by injecting thermoresponsive and biodegradable hydrogel with various properties

研究代表者

中谷 武嗣 (Nakatani, Takeshi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・部長

研究者番号：60155752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：心疾患は我が国の主要死亡原因の一つである。有効な新たな治療法として、比較的脆弱な高分子ゲルを疾患部位に注入することで新機能が改善するとの報告がなされた。本研究では、物性を広範囲に調製できるポリ乳酸-ポリエチレングリコールインジェクタブルゲルの治療効果を検討したところ、従来の非分解性材料と比較して、マイルドな炎症反応で同等の治癒効果を認めた。このことは、分解性をコントロールすることにより従来材料よりも優れた治療デバイスの設計が可能であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Heart disease is one of the major causes of death in Japan. Recently a new therapeutic strategy in which relatively weak polymeric hydrogels are injected into the infarcted area of heart was proposed. It seems to stop the cardiac remodeling and loss of heart function. In the present project, PEG-poly(lactic acid) injectable hydrogels with various properties were injected to the rat myocardial infarction model, and the heart functions were monitored. The biodegradable hydrogel resulted in the recovered heart function as well as the conventional nondegradable hydrogels. However, the inflammation was much milder than the conventional hydrogel. It can be then concluded that the synthetic biodegradable thermoresponsive hydrogel can be a good material for treating myocardial infarction.

研究分野：移植医療

キーワード：心筋梗塞 ゲル治療 アルギン酸 ポリ乳酸 ポリグリコール酸 ミセル

## 1. 研究開始当初の背景

心疾患の根治的療法は、補助人工心臓や心臓移植とされてきたなかで、心機能改善を目指した細胞移植例が報じられ、再生医療に期待が持たれた。また、力学的サポートを原理とするパチスタ手術などの効果も魅力的である。さらに、近年、アルギン酸ゲルのような非常に脆弱で組織との親和性や結合性が低いアルギン酸ゲルを注入することで心筋リモデリングが誘発されるという観察が報告され、新たな心筋症治療の可能性として注目されている(Circulation, March 18, 2008)。

いまだ、その詳細なメカニズムは解明されていないが、組織強度の保持と、接着性など、炎症誘導によるコラーゲン繊維構築など、生体に対するアクティブな作用が重要であると考えるのが妥当である。しかしながら、これを実証するためには、化学組成が類似であって広範囲に性質を代えられるインジェクタブルゲルが有用である(図1)。

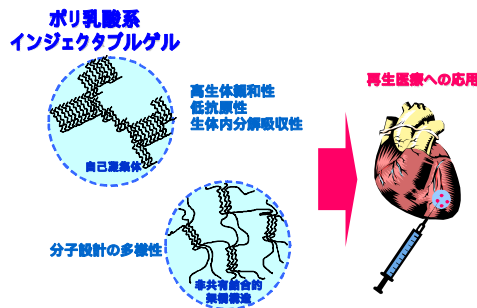


図1 本研究の概要

我々は、ポリ乳酸とPEGのみからなる物理架橋型インジェクタブルゲルを世界に先駆けて完成させた。(Macromol. Biosci., (2001))。本ハイドロゲルは、その組成と分子量を変化させることで、ゲル化時間、親水疎水性、細胞親和性、分解特性、炎症誘導性を大きく変化させることが可能である。

## 2. 研究の目的

そこで、ラットおよびウサギの冠動脈前下行枝結紮モデルにより作成した心筋梗塞部位へ、様々なインジェクタブルゲルを注入し、局所残留性、分解性、炎症誘導性、組織修復性、心壁圧変化、そして、心機能(駆出効率)改善性を検討し、生体内環境でゲル化し、かつ、生体吸収性である当該ゲルが有用であるかのエビデンス取得を目指した。

## 3. 研究の方法

現在までに、合成に成功したゲル化材料を用いたラット心筋梗塞治療実験を進めるとともに、ハイドロゲル物性を広範囲に制

御するための高次構造形成部分を探索する。共重合体量成分の組成と、それぞれのセグメントの分子量の異なるゲルを合成し、そのゲル化特性および得られたゲルの強度と生体成分との親和性を検討する。

【インジェクタブルゲルの合成とミセル懸濁液の調製】L 乳酸または D 乳酸と PEG とコハク酸(SA)をそれぞれ三口フラスコに入れ、150、500torr の条件下で反応させた。その後、触媒として p-トルエンスルホン酸と塩化スズを加え 150、5torr の条件下で重縮合を行った。得られた反応物は冷却したジエチルエーテルで再沈殿を行い、減圧乾燥にて目的物を得た。得られたポリマーはそれぞれ、テトラヒドロフラン(THF)に溶解し、超音波を照射しながらイオン交換水を加えた。THF を除去し分散液を調整した。

また、従来型のトリ架橋に寄与する PLA および PEG セグメントが 1 分子中に多数有するマルチブロック共重合体を合成し、架橋点を増加させることで弾性率の上昇を図った。

## 【ゲルの調製と物性評価】

ゲル化挙動については PLLA-PEG-SA と PDLA-PEG-SA の分散液を 1:1 で混合し、レオメータによりその動的粘弾性挙動を解析した。さらに、混合した分散液を 37 に加温した後、凍結乾燥して広角 X 線回折(WAXD)によりゲル化メカニズムを調査した。

## 【心筋梗塞治療実験】

左冠動脈を結紮後 4 週目の心筋梗塞モデルラットの治療前後における心室壁厚と左室内径について 7T 核磁気共鳴画像法(MRI)にて、評価した。さらに心筋梗塞作製から 4 週間のラットに対して 100 $\mu$ l ハイドロゲルを注入し、4 週間後の治療効果について超音波エコーによって心機能を評価し検討した。

## 4. 研究成果

【インジェクタブルゲルの解析】 PLLA-PEG および PDLA-PEG の Mw はそれぞれ、4600Da、8300Da であった。37 一定におけるレオロジー測定の結果、測定 1 時間後に貯蔵弾性率( $G'$ )は 8700Pa、損失弾性率( $G''$ )は 1000Pa であった。また、室温から 37 に加温することでゲル化することが目視確認でき、ゲル化時間は約 5 分であった(Figure2)。さらに WAXD によってゲル化メカニズムを確認した結果、PLLA-PEG および PDLA-PEG では見られなかったが PLLA-PEG と PDLA-PEG を混合し、ゲル化させたものではステレオコンプレックスのピークが検出された(Figure3)。この結果から、ステレオコンプレックスを架橋点としたハイドロゲルが作製できた。

次に分解試験では、1週間で約50%低下し、4週間後には約70%まで質量損失が認められた。(図1)

また、ヘキサメチレンジイソシアネート(HMDI)を加え140、15分鎖延長反応を行い合成したマルチブロック共重合体(PLLA-PEG-PLLA)<sub>m</sub> および(PDLA-PEG-PDLA)<sub>m</sub> では、ミセルサイズの減少だけでなく、混合後のゲル化の高速化、および、ゲル強度の向上が確認された。

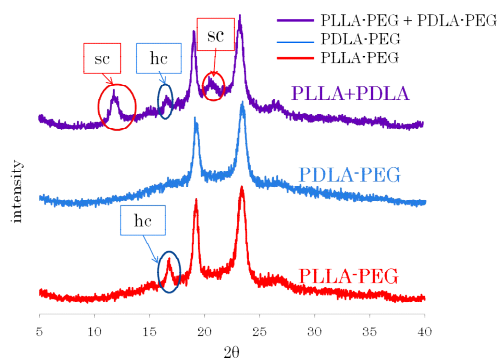


図1 WAXDによるゲル化の解析

#### 【心筋梗塞治療実験】

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。その結果、%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。(図2)

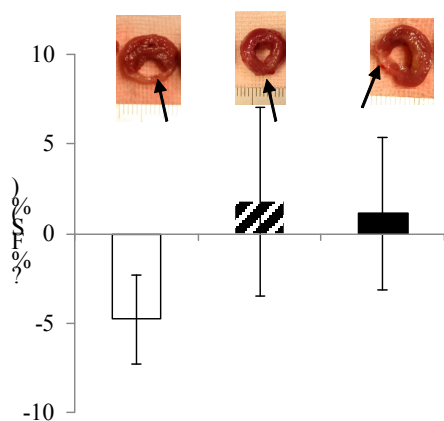


図2 高速部位へのインジェクタブルゲル注入後の%FSおよび心壁圧変化

したがって、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。一方、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

(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10件)

- 1) T. Ehashi, T. Takemura, N. Hanagata, T. Minowa, H. Kobayashi, K. Ishihara, T. Yamaoka, Comprehensive Genetic Analysis of Early Host Body Reactions to the Bioactive and Bio-Inert Porous Scaffolds, PLoS ONE, Vol. 9(1), 2014, e85132, 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0085132
- 2) S. Kakinoki, T. Yamaoka, Thermoresponsive elastin/laminin mimicking artificial protein for modifying PLLA scaffolds in nerve regeneration, Journal of Materials Chemistry B, Vol. 2(31), 2014, pp. 5061-5067  
DOI: 10.1039/c4tb00305e, 査読有
- 3) Y. Tachibana, J. Enmi, C. A. Agudelo, H. Iida, T. Yamaoka, Long-term/bioinert labeling of rat mesenchymal stem cells with PVA-Gd conjugates and MRI monitoring of the labeled cell survival after intramuscular transplantation, Bioconjugate Chemistry, Vol. 25(7), 2014, pp. 1243-51  
DOI: 10.1021/bc400463t, 査読有
- 4) S. Kakinoki, M. Nakayama, T. Moritan, T. Yamaoka, Three-layer microfibrillar peripheral nerve guide conduit composed of elastin-laminin mimetic artificial protein and poly(L-lactic acid), Frontiers in Chemistry, Vol. 2, 2014, pp. 38-45  
DOI: 10.3389/fchem.2014.00052, 査読有
- 5) T. Ehashi, S. Kakinoki, T. Yamaoka, Water absorbing and quick degradable PLLA/PEG multiblock copolymers reduced encapsulation and inflammatory cytokine production, Journal of Artificial Organs, Vol. 17, 2014, pp. 321-328  
DOI: 10.1007/s10047-014-0791-z, 査読有
- 6) Y.-I. Hsu, K. Masutani, T. Yamaoka, Y. Kimura, Tuning of Sol-gel Transition in the Mixed Polymer Micelle Solutions of

- Copolymer Mixtures Consisting of Enantiomeric Diblock and Triblock Copolymers of Polylactide and Poly(ethylene glycol), *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 216, 2015, pp. 837-846  
DOI: 10.1002/macp/201400581, 査読有
- 7) Y.-I. Hsu, K. Masutani, T. Yamaoka, Y. Kimura, Tuning of Sol-gel Transition in the Mixed Polymer Micelle Solutions of Copolymer Mixtures Consisting of Enantiomeric Diblock and Triblock Copolymers of Polylactide and Poly(ethylene glycol), *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 216, 2015, 837-846  
DOI: 10.1002/macp.201400581, 査読有
- 8) Y.-I. Hsu, K. Masutani, T. Yamaoka, Y. Kimura, Strengthening of hydrogels made from enantiomeric block copolymers of polylactide (PLA) and poly(ethylene glycol) (PEG) by the chain extending Diels-Alder reaction at the hydrophilic PEG terminals, *Polymer*, Vol. 67, 2015, pp. 157-166  
DOI:10.1016/j.polymer.2015.04.026, 査読有
- 9) S. Somekawa, K. Masutani, Yu-I Hsu, A. Mahara, Y. Kimura, T. Yamaoka, Size-controlled nanomicelles of poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) copolymers with a multiblock configuration, *Polymers*, Vol. 7(6), 2015, pp. 1177-1191  
DOI:10.3390/polym7061177, 査読有
- 10) T. Sato, O. Seguchi, Y. Yanase, S. Nakajima, M. Hieda, T. Watanabe, H. Sunami, Y. Murata, H. Hata, T. Fujita, J. Kobayashi, T. Nakatani, Serum brain natriuretic peptide concentration 60 days after surgery as a predictor of long-term prognosis in patients implanted with a left ventricular assist device, *ASAIO Journal*, Vol. 61, 2015, pp.373-378  
DOI: 10.1097/MAT.0000000000000237, 査読有
- 〔学会発表〕(計9件)
- 1) 染川将太、馬原淳、Hsu Yu-I、増谷一成、木村良晴、山岡 哲二, 心筋梗塞治療を目指したポリ乳酸/ポリエチレングリコール共重合体温度応答性インジェクタブルハイドロゲルの合成と物性評価, 第63回高分子学会年次大会, 2014年5月28日, 名古屋国際会議場, 愛知県
- 2) 徐 于懿, 増谷 一成, 青木 隆史, 山岡 哲二, 木村 良晴, 細胞注入足場材料に用いるポリ乳酸-b-ポリエチレングリコールのゾルーゲル転移と鎖延長制御, 第63回高分子学会年次大会, 2014年5月29日, 名古屋国際会議場, 愛知県
- 3) 神戸裕介, 山岡哲二, 機能性リコンビナントタンパク質によるシルクゲルへの血管誘導機能の付加, 第36回日本バイオマテリアル学会大会, 2014年11月18日, タワーホール船堀, 東京都
- 4) 神戸裕介, 山岡哲二, 血管誘導機能を有したシルクフィブロインゲル, 第24回日本MRS年次大会, 2014年12月12日, 横浜市開港記念会館, 神奈川県
- 5) 神戸裕介, 山岡哲二, 血管誘導能を有するフィブロインゲルの作製と応用, 第14回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 神奈川県
- 6) 柿木佐知朗、中山みどり、森反俊幸、山岡哲二, エラスチン-ラミニン模倣人工細胞外マトリクス混合ポリ乳酸ファイバーよりなる神経再生用スキャホールドの開発, 日本化学会第95春季年会, 2015年3月29日, 日本大学理工学部船橋キャンパス, 千葉県
- 7) Yu-I Hsu, Takashi Aoki, Yoshiharu Kimura, Y. Tetsuji Yamaoka, Tuning of gel properties by chainextension and improved applicability of the mixed aqueous dispersions consisting of polylactide-poly(ethylene glycol) diblock and triblock copolymers as cell-injectable scaffolds, The 5th Asian Biomaterials Congress, 2015年5月6日-9日, Taipei
- 8) Shota Somekawa, Kazunari Masutani, Yu-I Hsu, Atsushi Mahara, Yoshiharu Kimura, Tetsuji Yamaoka, Size control of poly(lactic acid-b-ethylene glycol) micelles by their multiblock structure, 第64回高分子年次大会, 2015年5月27日-29日, 札幌コンベンションセンター, 北海道
- 9) 染川将太、馬原 淳、増谷一成、木村良晴、山岡哲二, PLA-PEG ハイドロゲルによる慢性心筋梗塞後の心機能の改善と左室拡大抑制, 平成 27 年度 繊維学会秋季研究発表会, 2015年10月22日-23日, 京都工芸繊維大学, 京都府
- 〔図書〕(計2件)
- 1) 山岡哲二, バイオマテリアル研究の最前線, 日本金属学会, 151-152, 2014
- 2) 染川将太、木村良晴、山岡哲二, 「心筋梗塞に対するハイドロゲル注入療法」 In 医療用バイオベースマテリアル, シーエムシー出版, 214-222, 2014
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
該当無し
- 取得状況(計0件)  
該当無し

〔その他〕  
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 武嗣 (NAKATANI Takeshi)  
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・部長  
研究者番号：60155752

(2) 研究分担者

山岡 哲二 (YAMAOKA Tetsuji)  
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長  
研究者番号：50243126

(3) 研究分担者

柿木 佐知朗 (KAKINOKI Sachiro)  
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員  
研究者番号：70421419

(3) 研究分担者

徐 ヌイ (JYO Yui)  
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員  
研究者番号：10757678