

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861052

研究課題名(和文)デリバリーキャリアを用いた細胞治療効果の増強-血管新生と神経再生を指標として-

研究課題名(英文) Enhancement of the cell therapeutic potency using low-molecular weight heparin protamine complex

研究代表者

岸本 聡子 (Kishimoto, Satoko)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：10511488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが開発したフラグミン/プロタミン混合粒子(F/P NPs)を脂肪由来間質細胞(ASCs)のデリバリーキャリアとして使用し、重症化下肢虚血及び腹圧性尿失禁における細胞治療効果の増強を図った。

重症化下肢虚血では移植後7及び14日目にASCsにF/P NPsを併用することで治療効果が増強されることが明らかとなった。また、腹圧性尿失禁においてはASCs単独及びF/P NPs併用移植において、移植後7及び14日目に尿道括約筋断裂による尿漏出時圧低下に有意な改善効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fragmin/Protamine Nano-Particles (F/P NPs) are recently developed as low-molecular weight, biodegradable carriers for adipose-derived stromal cells (ASCs). We examined the ability of ASCs/F/P NPs aggregates to rescue limb loss in a mouse model of hindlimb ischemia and increase in urethral resistance in a rat model of vaginal distention.

The F/P NPs augmented the effects of ASCs on angiogenesis and reversal of limb ischemia on postoperative days 7 and 14. Leak point pressure (LPP) decreased after vaginal distension (VD) and was recovered after the periurethral injection of ASCs and ASCs/F/P NPs aggregates of 7 and 14 days after VD treatment.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 細胞移植 脂肪由来間質細胞 細胞キャリア 下部尿路障害 腹圧性尿失禁

1. 研究開始当初の背景

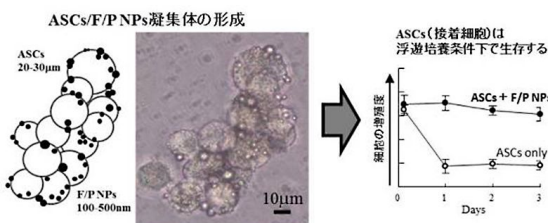
低侵襲で大量採取できる脂肪由来間質細胞 (ASCs) は、間葉系幹細胞を豊富に含み、患者本人からの自家移植も可能であるため、実現可能な細胞ソースとして有望視されている。しかしながら、投与後の細胞の生着率は必ずしも高くなく、治療効果を規定する律速段階であることが予想される。そこで、移植細胞の生存率や組織への生着率を高め、治療効果を上げるためのドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が求められている。

糖尿病性壊疽や閉塞性動脈硬化症等に対する血管新生療法では、重症化した末梢動脈疾患患者で既存の治療に十分な効果が得られない症例に対しては、下肢切断を余儀なくされる場合が多く、患者の生活の質 (QOL) を著しく低下させる。また、腹圧性尿失禁 (SUI) は尿道括約筋機能の障害により腹圧負荷時に尿が漏れるもので、女性では妊娠・出産・加齢による骨盤底筋群の脆弱化、男性では前立腺肥大症、前立腺癌の手術時の括約筋障害に起因し、潜在的な罹患者が多い。SUI の外科的治療として骨髄由来幹細胞を用いた下部尿路再建が行われているが、細胞培養過程での安全性の問題が残る。また、女性 SUI 患者に対して行われる尿道スリング手術は体内に異物を留置するという欠点があり、男性 SUI 患者に対しては有効な外科的治療法が無いのが現状である。

申請者はこれまでに、既存の医薬品である低分子化ヘパリン製剤のフラグミン (アニオン性) と、その拮抗剤であるプロタミン (カチオン性) を適切な条件下で混合して安定したナノ粒子 (F/P NPs; 100-500nm) を作製し (Mori, Kishimoto et al. 2010)、機能性タンパク質あるいは移植細胞の DDS として開発してきた。F/P NPs について、これまでに申請者は次のような研究結果を得ている。

(1) ヘパリン結合性の増殖因子を吸着・安定化して生理活性を高める (Kishimoto et al. 2013)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) や肝細胞増殖因子 (HGF)、多血小板血漿 (PRP) 分画に濃縮される種々の増殖因子等で、その効果が確認されている。

(2) 接着性細胞と凝集体 (スフェロイド) を形成する (Kishimoto et al. 2012)、F/P NPs は幹細胞を含む数種の接着性細胞よりはるかに小さく、これらに接着して1時間以内に細胞・粒子凝集体を形成する。細胞同士は、互いを足場として安定した環境を構築し、浮遊培養条件下で細胞の生存性が顕著に高まる。ASCs でも、ASCs/F/P NPs 凝集体が形成されることを確認している (下図参照)。



2. 研究の目的

申請者らが開発した F/P NPs は、サイトカイン局所投与や細胞治療等において、治療増強効果を示すことが期待される。本申請では、重症化下肢虚血および腹圧性尿失禁という異なる疾患の治療を目指して治療増強効果を評価する。

3. 研究の方法

(1) マウス重症化下肢虚血モデルにおける血管新生効果メカニズムの解析

麻酔下で BALB/c マウスの鼠蹊部皮下脂肪を採取し、酵素消化にて脂肪由来間質細胞 (ASCs) を回収した。ASCs と F/P NPs を混合して 37 °C で 1 時間インキュベートし、ASCs/F/P NPs 凝集体を作製した。

Layman H らの方法 (Biomaterials, 2007) を改変し、マウス重症化下肢虚血モデルを作製した。虚血部位周辺の筋肉に ASCs を複数箇所投与し (4×10^6 /mouse)、経時的にレーザードップラー血流計にて皮下血流を測定した。細胞投与後 7~14 日目まで血流回復効果を評価した。

移植細胞に GFP マウス由来 ASCs を使用し、移植部位での GFP 陽性細胞を観察した。

Andersen らの方法 (Acta Physiol Scand, 1975) を改変し、CD31 免疫染色による毛細血管数および毛細血管密度を算出した。

マウス重症化下肢虚血モデルの血流回復過程における末梢血中の各種サイトカインおよび成長因子の動向を測定した。

(2) ラット腹圧性尿失禁モデルを用いた治療効果の評価

麻酔下で SD ラットの鼠蹊部皮下脂肪を採取し、酵素消化にて脂肪由来間質細胞 (ASCs) を回収した。ASCs と F/P NPs を混合して 37 °C で 1 時間インキュベートし、ASCs/F/P NPs 凝集体を作製した。

Damaser MS らの方法 (J Urol, 2003) を改変し、ラットを用いて 2 種類の腹圧性尿失禁モデルを作製した。陰部神経切断モデル (PNT) は、内総腸骨動脈の腹側を横切る神経を骨盤神経と同定し、骨盤神経と交差して内総腸骨動脈の背側を走る神経を陰部神経と同定した。当該神経を 5~7mm 切除し、陰部神経切断モデルとした。腔過伸展モデル (VD) は、フォーリーカテーテル (6Fr) を腔に挿入してバルーンに蒸留水を 3mL 注入し、この状態で 4 時間留置した。

腔過伸展モデル (VD) を用いて細胞移植を実施した。外尿道口周囲を取り囲む外尿道括約筋に直接細胞を投与するため、外尿道口の 2, 4, 6, 8 および 10 時の方向で深さ約 8mm の部位に 5 か所細胞を注入した (2.5×10^6 /point)。細胞投与後 7~14 日目に尿漏出時圧 (LPP) を測定した。測定直前に T8-T9 レベルで脊髄を離断し、膀胱内圧測定用に膀胱頂部にカテーテルを留置した。LPP 測定は、ラットをスリングスーツに固定し、覚醒状態で実施した。

膀胱カテーテルを圧トランスデューサに接続し、外尿道口より尿が漏出するまで生理食塩水を 3ml/min で膀胱内に急速注入した。これを 1 分間隔で 8 回実施し、その平均値を LPP とした。A/D 変換器を通した信号は、Power Lab Chart® コンピュータソフトウェアにてグラフ化した。

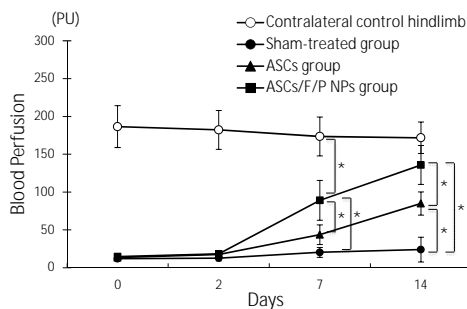
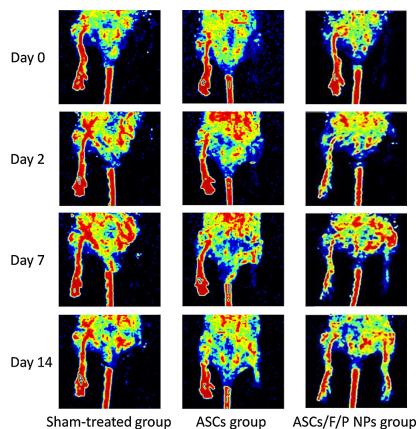
移植細胞に GFP ラット由来 ASCs を使用し、移植部位での GFP 陽性細胞を観察した。

尿道や膣壁とともに尿道括約筋を一括採取して M-T 染色および α -SMA 染色を実施し、病理組織学的に検討した。

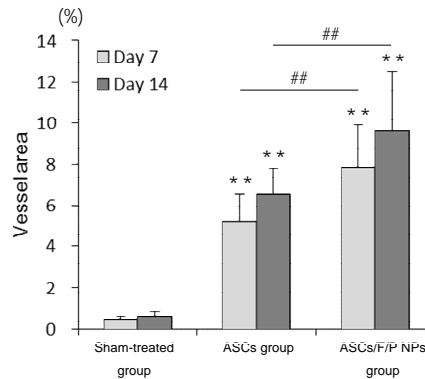
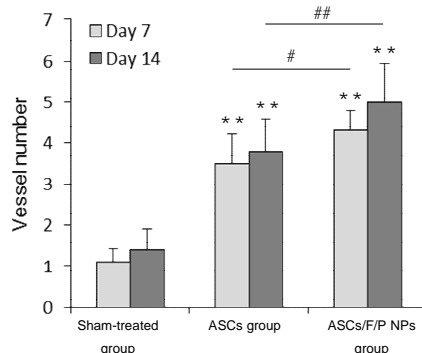
4. 研究成果

(1) マウス重症化下肢虚血モデルにおける血管新生効果メカニズムの解析

移植後 7~14 日目において、ASCs/F/P NPs 凝集体を投与した群で、ASCs 単独投与群よりも血流回復が有意に促進された。



病理組織学的にも、移植後 7 および 14 日目に CD31 陽性の新生血管数および毛細血管密度が有意に増加した。



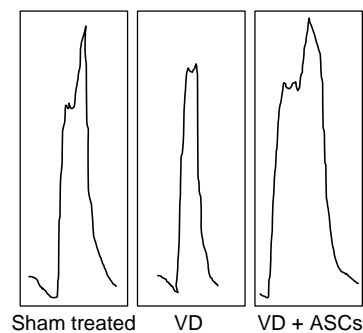
下肢虚血モデルの血流回復過程において、偽処理群よりも ASCs 単独投与群および ASCs/F/P NPs 凝集体投与群で、移植後 7 日までに末梢血中の GM-CSF, b-FGF, PDGF-bb, VEGF および HGF が上昇した。

以上より、ASCs に F/P NPs を併用することで、重症化下肢虚血性疾患の治療効果が増強されることが明らかとなった。

(2) ラット腹圧性尿失禁モデルを用いた治療効果の評価

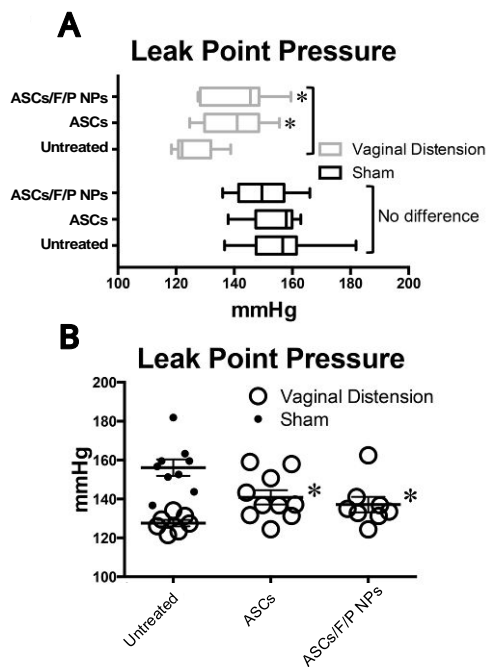
陰部神経切断モデルによる LPP 測定では、対照群と比較して切断直後および 4 週間後に LPP の低下はみられなかった。その原因として、神経切断に伴う平滑筋の代償作用があるとの報告があったため (Furuta et al. 2011), LPP 測定時に平滑筋をブロックする Hexamethonium の投与前後で LPP を測定した。その結果、Hexamethonium の投与前後で LPP の低下が確認されたため、平滑筋の代償が起こっている、すなわち作製したモデルは報告通り機能していることが明らかとなった。一方、膣過伸展モデル (VD) では対照群と比較してモデル作製直後、4 および 7 日後に LPP が約 20% 低下した。

作製方法の容易さおよび LPP 低下の結果より、VD モデルを使用して ASCs の移植実験を実施した。偽処理群では外尿道括約筋の収縮による二峰性の膀胱圧波形を示すが、VD 処置群では二峰性波形が出現する頻度が低いか、波形の高さ自体が低かった (LPP 低下)。



また、ASCs 移植は VD 無しでは LPP に有意な変化を示さなかったのに対し、VD 有りでは

有意な LPP 上昇 (回復) 効果を示した。

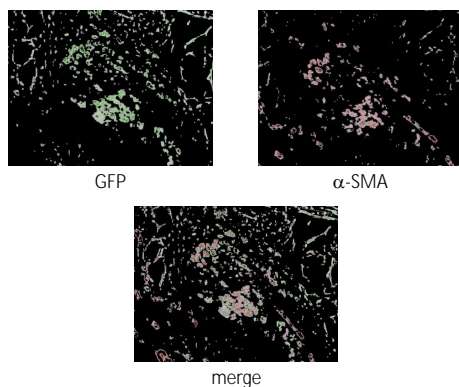


(A) VD 処置 7 日後の LPP 値

(B) VD 処置 14 日後の LPP 値

病理組織学的には、移植後 28 日目まで GFP 陽性の移植細胞の生存が確認された。GFP 陽性細胞と α -SMA 陽性細胞が高率で merge していることも確認され、ASCs が平滑筋へ分化する可能性が示唆された。移植部位では膠原繊維が増加する像も観察された。

以上より、ASCs 移植はそれ単独だけでなく F/P NPs を併用しても、尿道括約筋断裂による LPP 低下に有意な改善効果を示すことが明らかとなった。



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 1 件)

Satoko Kishimoto, Ken-ichi Inoue, Shingo Nakamura, Hidemi Hattori, Masayuki Ishihara, Masashi Sakuma, Shigeru Toyoda, Hideki Iwaguro, Isao Taguchi, Teruo Inoue, Ken-ichiro Yoshida: Low-molecular weight heparin protamine complex augmented the

potential of adipose-derived stromal cells to ameliorate limb ischemia. *Atherosclerosis* 2016; 249: 132-139. Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.04.003 (査読有)

[学会発表](計 5 件)

井上健一、岸本聡子、佐久間理吏、豊田茂、井上晃男: Synergistic cooperation of heterogeneous stromal cells for wound healing、第 81 回日本循環器学会学術集会、2017.3.17-19、石川県立音楽堂他(石川県・金沢市)

井上健一、山西友典、岸本聡子、井上晃男、吉田謙一郎: 尿道括約筋断裂による腹圧性尿失禁ラットモデルを用いた脂肪由来間質細胞の移植効果の検討、第 15 回日本再生医療学会総会、2016.3.17-19、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

井上健一、岸本聡子、佐久間理吏、豊田茂、田口功、井上晃男、吉田謙一郎: Low-molecular weight heparin protamine complex augmented the potential of adipose-derived stromal cells to ameliorate limb ischemia、第 43 回獨協医学学会、2015.12.5、獨協医科大学(栃木県・下都賀郡壬生町)

岸本聡子、井上健一、佐久間理吏、豊田茂、田口功、井上晃男: Nanoparticles of heparin and protamine complex augment the potential for adipose-derived stromal cells to ameliorate limb ischemia、第 79 回日本循環器学会学術集会、2015.4.24-26、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

山西友典、加賀勸家、内山智之、柴田千晴、岸本聡子、井上健一: ラットにおける陰部神経切断モデルと膣過伸展モデルの腹圧下尿漏出時圧における比較検討、第 7 回排尿障害モデル研究会、2014.12.5、グランディエールブクトーカイ(静岡県・静岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 聡子 (KISHIMOTO, Satoko)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号: 1 0 5 1 1 4 8 8