

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：25503

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23804

研究課題名（和文）世界初の幹細胞スフェアドラッグデリバリー技術を用いた再生治療

研究課題名（英文）Regenerative therapy using stem cell sphere drug delivery system

研究代表者

堀口 道子（Horiguchi, Michiko）

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・講師

研究者番号：70632470

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、再生治療を加速させる新しい幹細胞システムの開発を実施した。我々が研究を進めている幹細胞を用いた再生治療において、移植の成功を左右する重要な課題が移植に必要な品質の高い幹細胞を培養する技術である。幹細胞は培養条件に依存して、分化し幹細胞性を失うと、再生治療の材料としての能力が急激に低下してしまう。しかしながら、申請者は、この常識を覆し、幹細胞をスフェア状態で培養すると高い幹細胞性を保持したまま長期間培養できることを発見した。そこで、本研究では、幹細胞移植の生着率向上を目指して、幹細胞スフェアドラッグデリバリー技術を基盤とした新しい再生治療法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞を用いた再生治療は、未だに治療法の存在しない難治性疾患の根本的治療を可能とし、様々な疾患への応用が期待されている。しかしながら、幹細胞は培養中に品質が劣化しやすく、品質の高い幹細胞を安定して供給する事は非常に難しいため、再生治療の普及の障害となっている。

そのため、移植に適した幹細胞製剤化技術の開発が急務の課題であった。

本研究では、幹細胞スフェア培養法という新しい技術を開発することで、長期間安定して幹細胞の品質を保持する事に成功した。この研究成果は、幹細胞を用いた再生治療の普及へ繋がった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a new stem cell system for the regenerative therapy. In regenerative therapy, the high-quality stem cells were required for transplantation. We found that culturing stem cells in a sphere state allows them to be cultured for a long period of time while maintaining high stem cell properties. Therefore, in this study, we established a new regenerative therapy method based on stem cell sphere drug delivery technology with the aim of improving the survival rate of stem cell transplantation.

研究分野：薬剤学

キーワード：再生医療 幹細胞 製剤 DDS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、難治性の肺疾患や、がんで臓器を失った際の根本的な治療として、再生治療に取り組んできた。研究初期には、肺胞再生にかかわる低分子化合物やたんぱく質を同定し、肺胞再生効果を明らかにしてきた。軽度の肺胞破壊モデルでは発見した分化誘導剤が肺胞の再生を誘導する優れた効果を示したが、完全に肺胞構造が破壊された重症例では分化誘導剤の投与のみでは肺胞再生効果が不十分であり治癒には至らなかった。一方で、幹細胞を肺に直接移植すると顕著な肺胞の修復効果が確認されている。そのため、組織修復に重要な役割を果たす幹細胞に着目した。しかしながら、幹細胞は移植の際に剥離すると幹細胞性の著しい消失が認められ、安定して高い幹細胞性を保つのが困難であった。

そこで、申請者は、生着率の高い幹細胞移植による再生治療を実現するため、幹細胞の培養方法について研究を行った。そこで独自の幹細胞培養法である幹細胞スフェア培養法を確立した。幹細胞スフェア培養では、生体内に近い環境で幹細胞を培養することが可能であり、高い幹細胞性が保持された。

本研究では、幹細胞移植の生着率向上を目指して、幹細胞スフェアドラッグデリバリー技術を基盤とした新しい再生治療法を確立し、再生治療の発展に寄与する。

### 2. 研究の目的

肺胞再生治療法が確立できれば、治療法のない慢性閉塞性肺疾患や難治性の肺線維症の根治、外科的手術後の肺再建が可能となり、多くの患者の命を救う革新的な再生治療技術となる。申請者が研究を進めている幹細胞を用いた再生治療において、移植の成功を左右する重要な課題が、移植に必要な品質の高い幹細胞を培養する技術、そして移植後も安定した高い再生治療効果を有する幹細胞製剤の開発である。

幹細胞は培養条件に依存して、分化し幹細胞性を失うと、再生治療の材料としての能力が急激に低下してしまう。しかしながら、申請者は、この常識を覆し、ES細胞や体性幹細胞をスフェア状態で培養すると高い幹細胞性を保持したまま長期間培養できることを発見した。幹細胞スフェア培養では、細胞の特性に合わせた培地や添加剤の最適化が必要である。

本研究では高い幹細胞性を保つ製剤を構築するため、幹細胞スフェア製剤の調製・体内動態・有効性および安全性を検証する。

### 3. 研究の方法

#### ・幹細胞スフェアの調製および評価

移植に必要な品質の高い幹細胞を培養するため、申請者の独自技術である幹細胞スフェア培養法を用いて、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞に最適な培養条件を検討した。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞は、 $10\text{ cm}^2$ シャーレに、専用培地  $12\text{ mL}$  を用いて、 $5\% \text{ CO}_2$  濃度および  $37^\circ\text{C}$  のインキュベーター内で培養した。培養容器面積の  $70\sim 80\%$  程に増殖した状態で細胞を約  $5000\text{ cells/cm}^2$  の密度でまきかえて維持した。細胞の剥離には、トリプシン/EDTA溶液を用いた。

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞は、平均年齢 31 歳 (年齢幅 23~39 歳) の白人女性のドナーの脂肪組織から抽出された。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞は、CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 が  $90\%$  以上陽性であることが確認されており、CD14, CD31, CD45 が  $5\%$  以下の陰性である事が保証されている初代培養製品を LONZA 社から購入し使用した。培地は、血清・抗生物質・増殖因子を含む high glucose の専用の培地を LONZA 社より購入し使用した。ADSC は、幹細胞マーカーが保持されている 2~5 継代目のものを実験に使用した。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞は、法的許可を受けインフォームドコンセントを取得したドナーから樹立されたものを LONZA 社より購入して使用した。

増殖因子として BMP2、EPO、FGF2、G-CSF、IGF1、IL-3、IL-6 を添加した際の増殖活性について MTT アッセイ法を用いて検証した。調製した幹細胞スフェアの幹細胞性が保持されているかを確認するため、幹細胞マーカー CD90、CD73、CD105 抗原の発現を、フローサイトメトリーを用いて定量した。さらに、幹細胞スフェア製剤のアポトーシス、細胞老化の有無を確認した。

#### ・幹細胞製剤の蛍光顕微鏡による評価

移植した幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤の形状を明らかにするため、蛍光顕微鏡により幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤のアポトーシスマーカーや細胞老化マーカーや核膜タンパク質の発現を観察した。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞を 8well カルチャースライドに、

5000cells/cm<sup>2</sup>の密度で播種した。48時間後に、細胞を4%パラホルムアルデヒドを用いて20分間室温で固定した。T-TBSで洗浄し、DAPI入りの封入剤でマウントした。倒立型蛍光位相差顕微鏡(キーエンス、BZ-X700)を用いて、細胞を観察した。核膜の肥大化については、核膜タンパク質であるEmerinの発現を指標に蛍光顕微鏡での観察およびEmerinタンパク質発現量をWB法を用いて定量した。

・幹細胞製剤の透過型電子顕微鏡による評価

移植した幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤の経時的な変化を明らかにするため、電子顕微鏡により幹細胞構造を観察した。

透過型電子顕微鏡試料作製法は以下の通りである。

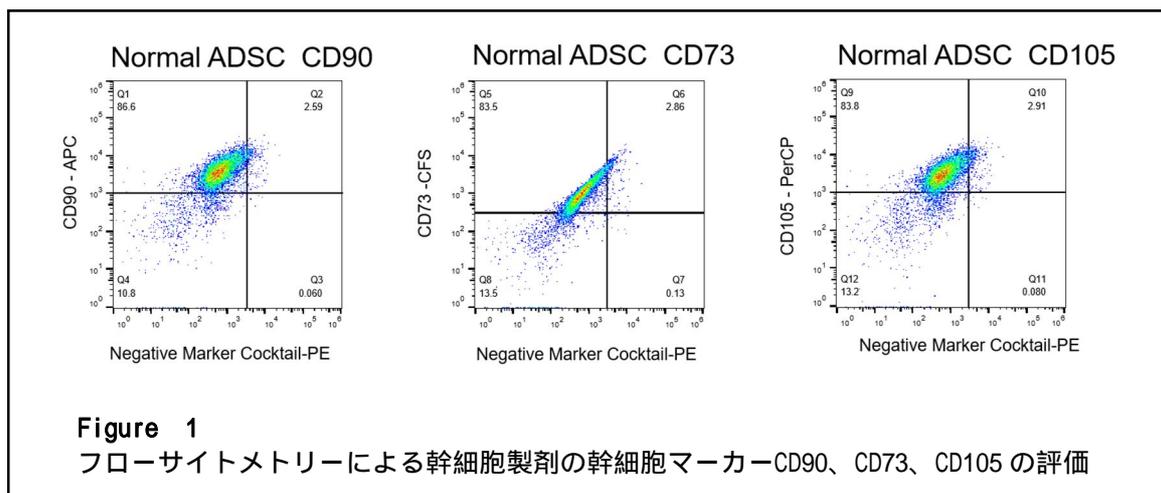
1. 前固定： 2%グルタルアルデヒド(0.1 M リン酸緩衝液 pH7.4) 4 一晚
2. 洗浄： 0.1 M リン酸緩衝液 pH7.4 4 一晚
3. 後固定： 2%オスミウム水溶液 4 2時間
4. 脱水： 上昇エタノール(30-100% EtOH) 4 -室温 各 15 min
5. 包埋： 包埋、エポキシ樹脂 60 48時間
6. 超薄切： ウルトラミクロト ム、80-90 nm 切片作製、200 メッシュに積載
7. 染色： 2%酢酸ウラン水溶液、鉛染色液
8. 観察： HITACHI H-7600 at 100kV

・幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤の移植評価

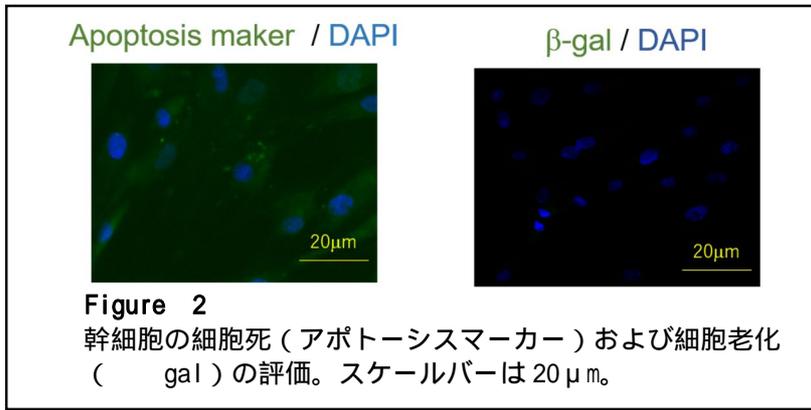
幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤の皮下移植モデルにおける移植後の生着を評価した。幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤は、スフェア培養用マトリゲルおよび専用培地に付属する増殖因子を添加して、移植1週間前からスフェア状に培養した。幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤を、移植用のマトリゲルに1対1の割合で混合した。10<sup>7</sup>cellsの間葉系幹細胞を含む移植用の混合液300μLを氷上でシリンジに充填し、免疫不全マウス(系統名BALB/cAJcl-nu/nu)の背部皮下に移植した。幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤を移植し2週間後の移植部位の縦横高さをノギスで計測し体積(mm<sup>3</sup>)を算出した。

4. 研究成果

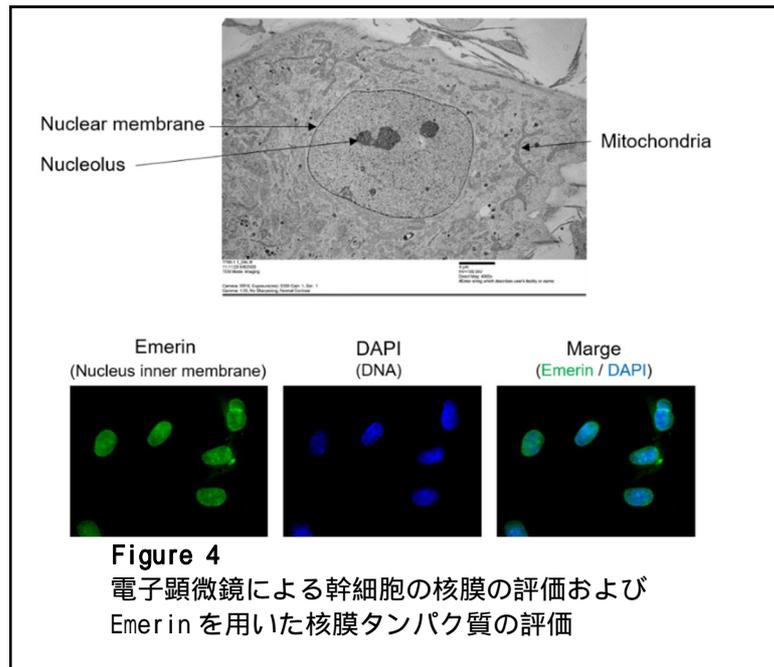
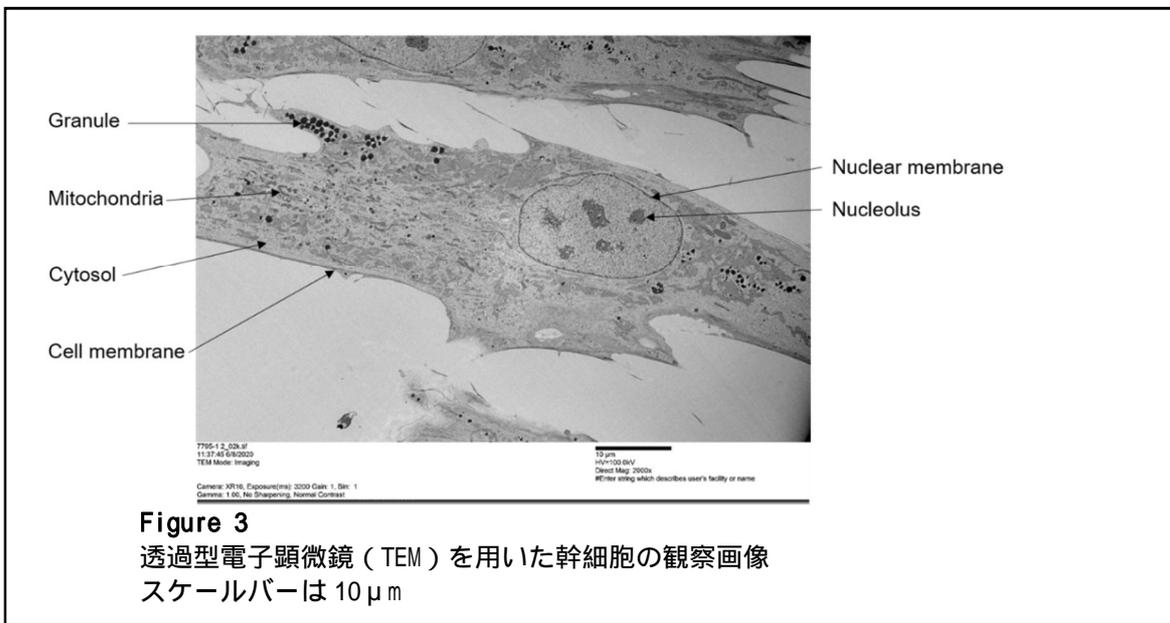
本研究では、幹細胞スフェアを基盤とした幹細胞製剤の構築と評価を行った。幹細胞スフェア製剤の幹細胞性を評価した結果、幹細胞マーカーCD90、CD73、CD105の高発現が確認でき、幹細胞スフェア製剤が高い幹細胞性を保持していることが明らかとなった(Figure 1)。

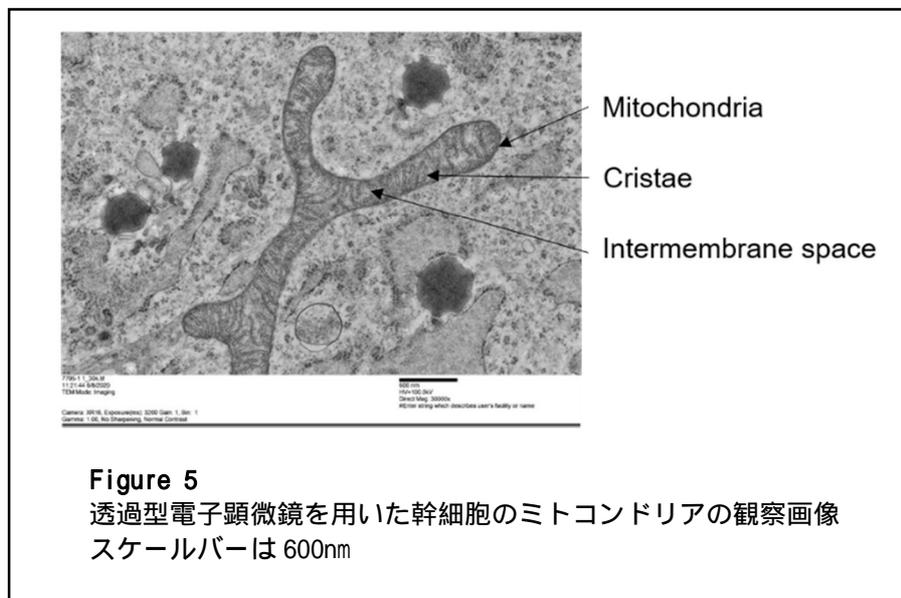


そこで、細胞の状態を確認するため、幹細胞製剤における細胞死(アポトーシスマーカー)および細胞老化(gal)の評価を行った。その結果、細胞死および細胞老化マーカー陽性細胞はほとんど観察されなかった(Figure 2)。



幹細胞製剤の経時的な変化を明らかにするため、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて細胞の観察を行った。その結果、細胞の形態に細胞に異常は観察されず、核膜やミトコンドリアも正常であった（Figure 3-5）。





**Figure 5**

透過型電子顕微鏡を用いた幹細胞のミトコンドリアの観察画像  
スケールバーは 600nm

幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤による再生治療効果を明らかにするため、皮下移植モデルを用いて治療効果を評価した。幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤では、移植部位での新生組織の増大が確認でき、移植 2 週間後の移植部位の体積は  $3407 \pm 637 \text{ mm}^3$  であった (Figure 6)。移植 3 週間後の移植片の重量は、 $1967 \pm 151\text{mg}$  であり、幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤の生着が確認された (Figure 6)。



**Figure 6**

幹細胞製剤の移植後の移植部位の画像および摘出した移植片の画像。スケールバーは 1cm。

本研究で開発した幹細胞スフェアドラッグデリバリー製剤は、高い幹細胞性を保持し、アポトーシスや細胞老化を起こしておらず高い品質が保たれていることが明らかとなった。細胞小器官の構造にも変性は認められず、移植後の生着が確認された。

本研究では幹細胞を高い品質で維持する方法を確立し、再生治療への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horiguchi Michiko, Hata Shinichi, Tsurudome Yuya, Ushijima Kentaro	4. 巻 25
2. 論文標題 Characterizing the degeneration of nuclear membrane and mitochondria of adipose derived mesenchymal stem cells from patients with type II diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 4298 ~ 4306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.16484	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 -

1. 著者名 Suzuki Chisato, Ushijima Kentaro, Ando Hitoshi, Kitamura Hiroko, Horiguchi Michiko, Akita Tomomi, Yamashita Chikamasa, Fujimura Akio	4. 巻 36
2. 論文標題 Induction of Dbp by a histone deacetylase inhibitor is involved in amelioration of insulin sensitivity via adipocyte differentiation in ob/ob mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chronobiology International	6. 最初と最後の頁 955 ~ 968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2019.1602841	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 堀口 道子
2. 発表標題 がんに負けない生活習慣
3. 学会等名 SHARE 国際オンライン勉強会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口 道子
2. 発表標題 家族性乳がんにおけるBRCA1遺伝子治療の有用性
3. 学会等名 第41回 日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口 道子
2. 発表標題 年会企画シンポジウム2 「健康長寿社会の実現に向けた癌の遺伝子治療戦略」
3. 学会等名 日本薬学会第35年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口 道子
2. 発表標題 体内時計とホルモンバランスの関係性
3. 学会等名 福岡市薬剤師会 Basic Study研修会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口 道子
2. 発表標題 The BRCT Domains of the BRCA1 and BARD1 Tumor Suppressors Differentially Regulate Homology-Directed Repair and Stalled Fork Protection
3. 学会等名 工薬学内研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口 道子、 鶴留 優也、 牛島 健太郎
2. 発表標題 臓器選択的ドラッグデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 山口東京理科大学 研究・技術公開2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口 道子
2. 発表標題 Integrin-nanoparticles regenerate collapsed alveoli
3. 学会等名 夏季 薬学部研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口 道子
2. 発表標題 幹細胞の遺伝子治療 による乳がんの根絶
3. 学会等名 夏季 薬学部研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口 道子
2. 発表標題 ドラッグデリバリー技術による臓器選択的治療
3. 学会等名 Information on Special Seminar Tokuron 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部堀口研究室  <a href="http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/michiko-horiguchi.html">http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/michiko-horiguchi.html</a>          ドラッグデリバリー技術による臓器選択的治療  <a href="https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/graduate/pdf/2ecb0e87846e9df0a6b9842d86d5bcb4c7532d04.pdf">https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/graduate/pdf/2ecb0e87846e9df0a6b9842d86d5bcb4c7532d04.pdf</a>          研究業績概要researchmap  <a href="https://researchmap.jp/horiguchim/">https://researchmap.jp/horiguchim/</a>          社会貢献活動「ほんものの科学体験講座」  <a href="https://ubenippo.co.jp/2019/07/12/46791/">https://ubenippo.co.jp/2019/07/12/46791/</a></p>
---

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

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		
米国	コロンビア大学 医学部		