

機関番号：24402
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592102
 研究課題名(和文) ナノスキャフォールドによる高有効性・低侵襲性ハイブリッド型血管新生療法の開発
 研究課題名(英文) Injectable Nano-Scaffolds, Hydroxyapatite-Polymer Nanocomposite Microsphere, Enhance the Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation
 研究代表者
 福本 真也 (FUKUMOTO SHINYA)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：90381996

研究成果の概要(和文)：重症虚血肢に対する細胞移植による血管新生療法の効果は十分とは言えず、効果を増幅する技術が必要である。我々は移植細胞を局所に維持する細胞足場としてナノサイズのハイドロキシアパタイト単結晶を被覆したポリ乳酸球状体(ナノスキャフォールド)を開発した。ナノスキャフォールドを骨髄単核細胞と混合して移植することで細胞を移植局所(筋肉組織内)に長期間担持し、血管新生療法の効果を増幅することを示した。

研究成果の概要(英文)：Clinical trials demonstrate the effectiveness of cell-based therapeutic angiogenesis against patients with a variety of ischemic disease; however, the clinical success to date has been still limited. We have reported that nano-scaled sintered hydroxyapatite (HAp)-coating on artificial grafts reveals marked cell-adhesiveness, safety and high tissue-affinity. With this nanotechnology, the inorganic, biodegradable and injectable scaffold, HAp-coated poly L-lactic acid (PLLA) microsphere, has been generated: named nano-scaffold (NS). In this study, we examined its usefulness in cell-based therapeutic angiogenesis. Bone marrow-mononuclear cells (BMC) alone, with uncoated PLLAs (LA), or with HAp-coated microspheres (nano-scaffold: NS), were intramuscularly injected into mice ischemic hind-limbs generated by femoral artery occlusion. Kaplan-Meier analysis demonstrated that NS+BMC treatment markedly prevented limb necrosis after the operation (vs. BMC alone, and LA+BMC). Roles of NS to sustain BMC in ischemic tissues were demonstrated by the findings that immunohistochemistry revealed NS and BMC co-localized, and that NS+BMC group exhibited significantly elevated intramuscular levels of proangiogenic cytokines in ischemic tissues as compared with BMC alone. We demonstrated usefulness of injectable scaffold as an enhancer for cell-based therapeutic angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒学、虚血性難治性潰瘍、血管新生療法

1. 研究開始当初の背景
 重症虚血肢に対する細胞移植による血管新

生療法の有効性が認知されているが、その効果は十分とは言えず、特に糖尿病や腎不全患

者ではその効果が減弱することが知られている。この血管新生療法の主な機序は、移植された細胞からの血管新生性サイトカインの分泌が重要であることが報告されているが、従来の移植方法では移植細胞が早期に移植局所から消失していくことも知らされており、細胞を局所に維持することが治療効果の増幅に繋がる可能性が高い。

2. 研究の目的

我々はナノテクノロジーを用いて移植細胞を局所に維持する細胞足場（ナノスキャフォールド：NS）を開発し、血管新生療法に対する有効性を検討した。

3. 研究の方法

ナノサイズのハイドロキシアパタイト（HAp）単結晶を生体吸収性高分子基材（ポリ乳酸）表面に被覆した100 μ m径の球状体（NS粒子）を開発し、細胞足場として用いた。マウス下肢虚血モデルは大腿動静脈の結紮切除にて作成し、虚血肢へマウス骨髄単核細胞（BMC）とNS粒子を共移植して虚血改善効果について検討した。コントロールにはHApコーティングしないポリ乳酸（LA）粒子および細胞単独移植を用いた。

4. 研究成果

カプランマイヤー法にてNS粒子+BMC群では他の群に比較し有意に壊死回避率の改善を認めた（ $P < 0.05$ ）。免疫組織学的検討（CD31染色）ならびに3D-CT血管造影による血管新生の評価でもNS粒子+BMC群で著明な有効性を認めた。移植局所におけるBMC保持性については、EGFP transgenicマウス由来のBMCを移植し、患肢筋肉組織中のGFPをELISA法にて定量比較した。NS粒子+BMC群ではBMC単独群に比較し術後3日目で約2倍（ $P < 0.05$ ）、7日目で約4倍（ $P < 0.05$ ）高値となりNS粒子の良好なBMC担持性を示唆した。組織学的評価でもGFP陽性細胞のNS粒子周囲への集積を確認した。患肢筋肉組織中の血管新生性サイトカインではVEGFとFGF2が術後3日目と7日目にNS+BMCs群で他群に比し有意に高値（ $P < 0.05$ ）であった。このように、HApコーティングポリ乳酸粒子（ナノスキャフォールド）は長期間骨髄単核細胞を移植局所に保持し移植細胞からのパラクライン効果を増強することで血管新生療法の効果を増幅すると考えられた。

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3件）

- ① Kawaguchi Y, Fukumoto S, Inaba M,

Koyama H, Shoji T, Shoji S, Nishizawa Y. Different impacts of neck circumference and visceral obesity on the severity of obstructive sleep apnea syndrome. *Obesity*. 19;276-282:2011. (査読有り)

- ② 岡田正弘, 福本真也, 三間洋平, 藤井秀司, 古菌勉. 新しい細胞移植療法のためのナノアパタイトコーティング微粒子材料の開発. *バイオマテリアル-生体材料* -.28;88-95:2010 (査読有り)
- ③ Hiroki Ueno, Shinya Fukumoto, Hidenori Koyama, Shinji Tanaka, Takaaki Maeno, Masahiro Murayama, Yoshiko Otsuka, Yohei Mima, Yuji Kawaguchi, Tetsuo Shoji, Masaaki Inaba, Yoshiki Nishizawa. Regions of Arterial Stenosis and Clinical Factors Determining Transcutaneous Oxygen Tension in Patients with Peripheral Arterial Disease. *J Atheroscler Thromb*. 17;858-869:2010. (査読有り)

〔学会発表〕（計12件）

- ① 大阪市立大学（福本真也）、近畿大学（古菌勉）、大阪工業大学（藤井秀司）、グンゼ（松田晶二郎）. 虚血下肢の切断回避を実現する細胞移植用ナノスキャフォールドの開発. Nano tech 2011. 第10回国際ナノテクノロジー総合展・技術会議. 2011年2月16日—18日. 東京、東京ビッグサイト
- ② 福本真也. 重症下肢虚血に対する細胞移植/血管新生療法の治療効果を増幅するInjectable Cell Scaffoldsの開発. 平成22年度大阪市立大学重点研究「バイオインターフェース先端マテリアルの創生」第1回シンポジウム（招待講演）. 2011年2月14日. 大阪市、大阪市立大学学術情報総合センター
- ③ 福本真也. 重症下肢虚血に対する代謝内科での取り組み. 第5回BREAKING研究会（招待講演）. 2010年11月29日. 大阪市、スイスホテル南海
- ④ 福本真也、三間洋平、田中新二、小山英則、大阪市大足治療チーム、絵本正憲、庄司哲雄、西澤良記、稲葉雅章. 糖尿病足病変に対する内科的取り組みと新たな展開. 第47回日本糖尿病学会近畿地方会（招待講演）. 2010年11月13日. 大阪市、大阪国際会議場
- ⑤ 福本真也. 末梢血管疾患の内科的診療と最近の取り組み. 第14回末梢循環障害のケアと治療研究会. 2010年11月4日. 大阪市、ホテルグランビア大阪.

- ⑥ 三間洋平、福本真也、小山英則、岡田正弘、田中新二、古藺勉、西澤良記、稲葉雅章。重症下肢虚血に対する細胞移植/血管新生療法の治療効果を増幅する Injectable Nano-Scaffold の開発。第 25 回日本糖尿病合併症学会。2010 年 10 月 22 日。滋賀県、大津市、ピアザ淡海
- ⑦ 福本真也。重症下肢虚血に対する細胞移植/血管新生療法の治療効果を増幅する Injectable Cell Scaffold の開発。第 2 回 Kansai Cardiovascular & Metabolic Frontier (KCMF)。2010 年 9 月 25 日。大阪市、ホテルニューオオタニ大阪
- ⑧ Yohei Mima, Shinya Fukumoto, Hidenori Koyama, Masahiro Okada, Shinji Tanaka, Masahiro Murayama, Yoshiko Otsuka, Tsutomu Furuzono, Masaaki Inaba, Yoshiki Nishizawa. Injectable Cell Scaffolds, Hydroxyapatite Polymer Nanocomposite Microsphere, Enhance the Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation. American Diabetes Association's 70th Scientific Sessions, June 25-29, 2010, Orlando, FL, USA.
- ⑨ 三間洋平、福本真也、小山英則、岡田正弘、田中新二、村山正洋、大塚淑子、古藺勉、稲葉雅章、西澤良記。重症下肢虚血に対する細胞移植/血管新生療法の治療効果を増幅する Injectable Nano Scaffold の開発。第 55 回日本透析医学会 学術集会・総会。2010 年 6 月 20 日。神戸市、神戸ポートピアホテル
- ⑩ 三間洋平、福本真也、小山英則、岡田正弘、田中新二、村山正洋、大塚淑子、古藺勉、稲葉雅章、西澤良記。重症下肢虚血に対する細胞移植/血管新生療法の治療効果を増幅する Injectable Nano Scaffold の開発。第 53 回日本糖尿病学会 年次学術集会。2010 年 5 月 29 日。岡山市、ラヴィール岡山
- ⑪ Shinya Fukumoto, Yohei Mima, Hidenori Koyama, Masahiro Okada, Shinji Tanaka, Masahiro Murayama, Yoshiko Otsuka, Tsutomu Furuzono, Yoshiki Nishizawa. Injectable Cell Scaffolds of Hydroxyapatite-Polymer Nanocomposite Microspheres Enhance Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation. 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2009, 7, 17. 山口県下関市
- ⑫ 福本真也、古藺勉。血管再生治療用ナノセラミックスキャホールド。イノベーション・ジャパン 2008。2008 年 9 月 17 日。

東京国際フォーラム・東京

〔図書〕(計 1 件)

- ① 藤井秀司、岡田正弘、古藺勉、福本真也。シーエムシー出版。新材料・新素材シリーズ コアシェル微粒子の設計・合成技術・応用の展開 (監修) (分担) 第 7 章 ピッカリングエマルジョン法によるコアシェル粒子の合成。2010 年、p.101-114

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：医療用組成物および医療用キット
 発明者：福本真也、小山英則、西沢良記、古藺勉、岡田正弘
 権利者：公立大学法人大阪市立大学、
 (財) ヒューマンサイエンス振興財団
 種類：特許
 番号：特願 2008-169433
 出願年月日：2008 年 6 月 27 日
 国内外の別：国内

名称：医療用組成物および医療用キット
 発明者：福本真也、小山英則、西沢良記、古藺勉、岡田正弘
 権利者：公立大学法人大阪市立大学、
 (財) ヒューマンサイエンス振興財団
 種類：特許
 番号：国際出願番号；PCT/JP2009/061726
 出願年月日：2009 年 6 月 26 日
 国内外の別：国外；国名：PCT

〔その他〕

新聞発表

- ① 2009 年 8 月 5 日 毎日新聞「くらしナビ Medical-自己血使用 負担すくなく-血管再生治療医療」
- ② 2010 年 2 月 12 日 日刊工業新聞「ナノテク成果“開花”テーマは「グリーン」NEDO、展示会に出展」
- ③ 2010 年 2 月 16 日 化学工業日報「細胞接着性 8 倍に-アパタイト単結晶コート微粒子を利用-血管新生治療で新手法 末梢動脈疾患に有用」
- ④ 2011 年 2 月 22 日日本経済新聞朝刊 P38 「血管再生医療効果微粒子加え向上」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福本 真也 (FUKUMOTO SHINYA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90381996

(2)研究分担者

小山 英則 (KOYAMA HIDENORI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80301852

(3)連携研究者

古菌 勉 (FURUZONO TSUTOMU)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：30332406

岡田 正弘 (OKADA MASAHIRO)
大阪歯科大学・歯科理工学講座・助教
研究者番号：70416220