

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560233

研究課題名(和文) ナノ薄膜を用いる細胞・薬剤の同時送達システムと局所体内環境モニタリング

研究課題名(英文) Polymeric nanosheets for cell and drug delivery and in vivo local monitoring

研究代表者

梶 弘和 (Kaji, Hirokazu)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70431525

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)：加齢黄斑変性等の難治性網膜疾患の細胞移植治療に向けて、柔軟かつ拒絶反応の小さい自己支持性高分子ナノ薄膜から成る多機能性の細胞培養・移植担体を開発した。生分解性のナノ薄膜上で網膜色素上皮(RPE)細胞を培養したところ、網膜色素上皮に特徴的なヘキサゴナルな細胞形態を示し、モノレイヤー組織を形成した。微小な医療用シリンジ針にてRPE細胞担持ナノ薄膜を細胞組織の形態や生存率に大きな影響を与えることなく射出できることがわかった。機能化したナノ粒子をナノ薄膜に搭載することで、薬剤担持機能、および酸素・pHセンサ機能を付与できた。今後、幹細胞治療実現を支援する医療デバイスとしての展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Multifunctional cell culture scaffolds consisting of flexible, ultrathin polymeric films (nanosheets) have been developed toward cell transplantation therapy for intractable retinal diseases such as age-related macular degeneration. Retinal pigment epithelial (RPE) cells cultured on biodegradable nanosheets formed a monolayer with hexagonal tight junctions found in native tissues. It is found that those cell/nanosheet composites can be aspirated and injected by a syringe needle without significant loss of cell morphology and viability. Also, the ability to release drugs and to sense oxygen and pH could be given to nanosheets by loading functionalized nanoparticles into nanosheets. The developed nanosheets would be expected as a biomedical device to support stem cell therapy.

研究分野：バイオ工学

キーワード：細胞・組織工学材料

1. 研究開始当初の背景

難治性疾患に対する細胞移植療法の社会的なニーズ拡大に伴い、再生医療分野では種々の疾患に応じた機能性足場材料の開発が進められている。眼科領域における難治性疾患の一つである加齢黄斑変性は、網膜組織中心の黄斑に異常な老化現象が起り、視機能が低下する失明リスクの極めて高い疾患である。社会の高齢化に伴い近年患者数が急激な増加傾向にあり、治療法の実現が喫緊の課題となっている。今日までに、網膜色素上皮(RPE)細胞などの視細胞懸濁液を医療用シリンジにて直接注入する細胞移植療法が検討されているが、眼底下の狭小な黄斑部へ分散した細胞を安定に送達・生着させることが極めて困難なため治療効果が低いことが課題となっている。最近では、iPS細胞から作製したRPE細胞シートを患部に移植する試みも検討されているが、狭小な網膜下に低侵襲かつ効果的に細胞シートを送達する手法の確立が課題である。

2. 研究の目的

本研究では、柔軟かつ生体拒絶反応の小さい生分解性の自己支持性高分子ナノ薄膜を利用して新しい細胞送達システムを開発する。まず、ナノ薄膜の材料物性や表面構造とRPE細胞の挙動の関連付けを行い、ナノ薄膜上で培養するRPE細胞の組織機能を制御する。次に、網膜下でのナノ薄膜の伸展を可能にするために、ナノ薄膜の設計に宇宙構造物工学の概念を取り入れ、ナノ薄膜に自己展開機能を付与する。また、申請者らがこれまでに開発してきた経強膜ドラッグデリバリーシステムで得た知識とノウハウを本研究に還元し、ナノ薄膜に薬剤徐放機能も付与する。さらに、ナノ粒子型の酸素やpHセンサプローブをナノ薄膜に搭載し、移植後の眼内環境モニタリングへの展開を模索する。

3. 研究の方法

自己支持性高分子ナノ薄膜を多機能化し、難治性網膜疾患の細胞移植治療へ応用するための基盤技術を整備した。まず、生分解性の医用高分子から成るナノ薄膜を調製し、材料物性を評価した上で、ナノ薄膜上でのRPE細胞の組織レベルでの挙動制御を検討した。その後、微小径シリンジで眼内に送達される細胞担持ナノ薄膜の網膜下での展開性向上のために、ナノ薄膜に自己展開機能の付与を検討した。また、機能化したナノ粒子をナノ薄膜に搭載することで、薬剤徐放機能、および酸素・pHセンサ機能の追加を検討した。以上を踏まえて、ラット眼球へのナノ薄膜送達試験を行った。

4. 研究成果

高分子材料として、ポリ乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)、ポリ乳酸(PLA)、光硬化性ポリエチレングリコール(PEG)を用い

て数百マイクロからミリメートル径のナノ薄膜を作製した。ナノ薄膜直径の半分の径の注射針等の細管でナノ薄膜の吸引・射出が可能であり、射出後もナノ薄膜が元の形状に戻ることを確認した。PLGAナノ薄膜上にRPE細胞を播種して培養したところ、RPE細胞は網膜色素上皮に特徴的なヘキサゴナルな細胞形態を示し、モノレイヤー組織を形成した。また、ナノ薄膜の表面粗さを増加させたところ、タイトジャンクションの形成が促進されることがわかった。ナノ薄膜のサイズが数ミリメートルスケールになると、液中での分散安定性が低下するため、ナノ薄膜への自己展開構造の付与を検討した。まず、引張りずみを付与した伸縮層と支持層でナノ薄膜を挟み込んだ3層構造を用いることで、自動的な円筒形状形成を実現した。さらに、水溶性高分子であるポリビニルアルコール(PVA)を支持層と伸縮層に用い、これを水中で溶解して伸縮層に付与しておいた初期応力を解放することで、ナノ薄膜が平面形状展開することを確認した。薬剤を含浸させたコラーゲン微粒子をナノ薄膜に包埋することで、薄膜から薬剤を徐放できることを確認した。蛍光標識したアルブミンを搭載した薄膜をラット眼球の強膜上に移植したところ、4週間後にも強膜および網膜から蛍光が検出された。アミノ化ポリスチレンビーズを酸素およびpH応答性色素で共染色することで、酸素とpHの同時計測が可能であることを確認した。また、このビーズをナノ薄膜内に均一に混合できることを確認した。RPE細胞担持ナノ薄膜をシリンジ針にてラット網膜下に注入し、光干渉断層計および組織切片で評価したところ、網膜下にRPE細胞担持ナノ薄膜の存在が示唆された。今後、病態モデル動物を用いて多機能化したナノ薄膜の有効性評価が期待される。

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14件)

(1) Nobuhiro Nagai, Satoru Iwata, Hirokazu Kaji, Kaori Sampei, Yuki Katsukura, Hideyuki Onami, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe, "Protective effects of sustained unoprostone delivery against retinal degeneration in S334ter rhodopsin mutant rats" J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. (Epub ahead of print, 2015). 査読有

doi:10.1002/jbm.b.33522

(2) Zhaleh Kashkouli Nezhad, Nobuhiro Nagai, Kotaro Yamamoto, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Hideyuki Saya, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe, "Application of clotrimazole via a novel controlled

release device provides potent retinal protection” *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26, 230 (2015). 査読有
doi:10.1007/s10856-015-5561-9
(3)Kuniaki Nagamine, Yuina Abe, Hiroyuki Kai, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, “Highly stretchable cell-cultured hydrogel sheet” *RSC Advances* 5, 66334-66338 (2015). 査読有
doi:10.1039/c5ra11059a
(4)Kuniaki Nagamine, Takuya Hirata, Kohei Okamoto, Yuina Abe, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, “Portable micropatterns of neuronal cells supported by thin hydrogel films” *ACS Biomater. Sci. Eng.* 1, 329-334 (2015). 査読有
doi:10.1021/acsbiomaterials.5b00020
(5)Serge Ostrovidov, Samad Ahadian, Javier Ramon-Azcon, Vahid Hosseini, Toshinori Fujie, S. Prakash Parthiban, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Hirokazu Kaji, Murugan Ramalingam, Hojae Bae, Ali Khademhosseini, “Three-dimensional co-culture of C2C12/PC12 cells improves skeletal muscle tissue formation and function” *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (Epub ahead of print, 2015). 査読有
doi:10.1002/term.1956
(6)Vahid Hosseini, Philip Kollmannsberger, Samad Ahadian, Serge Ostrovidov, Hirokazu Kaji, Viola Vogel, Ali Khademhosseini, “Fiber-assisted molding (FAM) of surfaces with tunable curvature to guide cell alignment and complex tissue architecture” *Small* 10, 4851-4857 (2014). 査読有
doi:10.1002/smll.201400263
(7)Masato Sasaki, Bijoy Chandapillai Karikkineth, Kuniaki Nagamine, Hirokazu Kaji, Keiichi Torimitsu, Matsuhiko Nishizawa, “Highly conductive stretchable and biocompatible electrode-hydrogel hybrids for advanced tissue engineering” *Adv. Healthcare Mater.* 3, 1919-1927 (2014). 査読有
doi:10.1002/adhm.201400209
(8)Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Noriko Osumi, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe, “A platform for controlled dual-drug delivery to the retina: protective effects against light-induced retinal damage in rats” *Adv. Healthcare Mater.* 3, 1555-1560 (2014). 査読有
doi:10.1002/adhm.201400114
(9)Kuniaki Nagamine, Kohei Okamoto, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa,

“Bonding of synthetic hydrogels with fibrin as the glue to engineer hydrogel-based biodevices” *J. Biosci. Bioeng.* 118, 94-97 (2014). 査読有
doi:10.1016/j.jbiosc.2013.12.024
(10)Samad Ahadian, Javier Ramón-Azcón, Haixin Chang, Xiaobin Liang, Hirokazu Kaji, Hitoshi Shiku, Ken Nakajima, Murugan Ramalingam, Hongkai Wu, Tomokazu Matsue, Ali Khademhosseini, “Electrically regulated differentiation of skeletal muscle cells on ultrathin graphene-based films” *RSC Advances* 4, 9534-9541 (2014). 査読有
doi:10.1039/C3RA46218H
(11)Kuniaki Nagamine, Kohei Okamoto, Shingo Otani, Hirokazu Kaji, Makoto Kanzaki, Matsuhiko Nishizawa, “Hydrogel-based bioassay sheets for in vitro evaluation of contraction-dependent metabolic regulation in skeletal muscle cells” *Biomater. Sci.* 2, 252-256 (2014). 査読有
doi:10.1039/C3BM60179J
(12)Serge Ostrovidov, Vahid Hosseini, Samad Ahadian, Toshinori Fujie, S. Prakash Parthiban, Murugan Ramalingam, Hojae Bae, Hirokazu Kaji, Ali Khademhosseini, “Skeletal muscle tissue engineering: Methods to form skeletal myotubes and their applications” *Tissue Eng. B* 20, 403-436 (2014). 査読有
doi:10.1089/ten.TEB.2013.0534
(13)Toshinori Fujie, Yoshihiro Mori, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Hojae Bae, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Toshiaki Abe, Ali Khademhosseini, Hirokazu Kaji, “Micropatterned polymeric nanosheets for local delivery of an engineered epithelial monolayer” *Adv. Mater.* 26, 1699-1705 (2014). 査読有 (Featured in *Global Medical Discovery*, June 27, 2014)
doi:10.1002/adma.201301300
(14)Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe, “A polymeric device for controlled transscleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye” *Acta Biomater.* 10, 680-687 (2014). 査読有
doi:10.1016/j.actbio.2013.11.004

〔学会発表〕(計 16 件)

(1)近藤太郎, Zhaleh Kashkouli Nezhad, 網島俊一, 陳俐君, 永井展裕, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “高分子薄膜を用いたインジェクション可能な薬剤徐放デバイスの開発” 第 28 回バイオエンジニアリング講演

会, 東京工業大学, 東京, 2016年1月9, 10日

(2)近藤太郎, Zhaleh Kashkouli Nezhad, 永井展裕, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “自己展開型薬剤徐放高分子デバイスの開発” 化学とマイクロ・ナノシステム学会, 北九州国際会議場, 福岡, 2015年11月26, 27日

(3)Hirokazu Kaji (Invited), “Polymeric thin films for cell and drug delivery” IEEE-NANOMED 2015, Hawaii, USA, Nov. 15-18, 2015.

(4)近藤太郎, Zhaleh Kashkouli Nezhad, 綱嶋俊一, 陳 俐君, 永井展裕, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “高分子薄膜を用いた自己展開型薬剤徐放デバイスの開発” 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ, 京都, 2015年11月9, 10日

(5)Hirokazu Kaji, Taro Kondo, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe, “Injectable ultrathin polymeric films for subretinal cell delivery” 2015 BMES Annual Meeting, Tampa, Florida, USA, Oct. 7-10, 2015.

(6)Hirokazu Kaji, Taro Kondo, Yoshihiro Mori, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe, “Injectable polymeric nanosheets for subretinal cell delivery” 4th TERMIS World Congress, Boston, MA, USA, Sep. 8-11, 2015.

(7)近藤太郎, Zhaleh Kashkouli Nezhad, 永井展裕, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “高分子薄膜を用いた薬剤徐放デバイスの開発” 第31回日本DDS学会学術集会, 京王プラザホテル, 東京, 2015年7月2, 3日

(8)Hirokazu Kaji (Plenary lecture), “Cell manipulation based on micro/nanotechnologies and biomedical application” 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM), Kyoto University, Kyoto, June 8-10, 2015.

(9)Hirokazu Kaji, Yoshihiro Mori, Toshinori Fujie, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe, “Subretinal injection of micropatterned nanosheets for effective cell delivery” 2015 Annual Meeting of the Society For Biomaterials, Charlotte, NC, USA, Apr. 15-18, 2015.

(10)梶 弘和 (招待講演), “マイクロ・ナノ技術を用いた細胞操作と医工領域への展開” 電気化学会第82回大会, 横浜国立大学, 横浜, 2015年3月15~17日

(11)Yoshihiro Mori, Toshinori Fujie, Nobuhiro Nagai, Matsuhiko Nishizawa, Ali Khademhosseini, Toshiaki Abe, Hirokazu Kaji, “Micropatterned polymeric ultra-thin films for cell delivery” International Symposium on 3D tissue fabrication, University of Tokyo, Tokyo, May 20, 21, 2014.

(12)梶 弘和, 森 好弘, 藤枝俊宣, 永井

展裕, 西澤松彦, 阿部俊明, “ナノ薄膜を用いた細胞デリバリーシステムの開発” 第21回 HAB 研究機構学術年会, 昭和大学, 東京, 2014年5月16, 17日

(13)Hirokazu Kaji, Toshinori Fujie, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe, “Local delivery of an engineered epithelial monolayer by micropatterned polymeric Nanosheets” ARVO 2014 Annual Meeting, Orlando, Florida, USA, May 4-8, 2014 (Selected as a “Hot Topic” awarded to less than 3% of all papers).

(14)Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Matsuhiko Nishizawa, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe, “Controlled transscleral dual-drug delivery by a polymeric device reduces light-induced retinal damage” ARVO 2014 Annual Meeting, Orlando, Florida, USA, May 4-8, 2014.

(15)Toshinori Fujie, Yoshinori Mori, Matsuhiko Nishizawa, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe, Ali Khademhosseini, Hirokazu Kaji, “Injectable micropatterned polymeric nanosheets for local delivery of an engineered epithelial monolayer” 2014 MRS Spring Meeting & Exhibit, San Francisco, CA, USA, Apr. 21-25, 2014.

(16)Hirokazu Kaji, Toshinori Fujie, Yoshinori Mori, Nobuhiro Nagai, Ali Khademhosseini, Toshiaki Abe, “Cell delivery system using micropatterned polymeric nanosheets” 2014 Annual Meeting of the Society For Biomaterials, Denver, CO, USA, Apr. 16-19, 2014.

〔図書〕(計2件)

(1)Toshiaki Abe, Yumi Tokita-Ishikawa, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Nobuhiro Nagai, “Intrascleral transplantation of a collagen sheet with cultured brain-derived neurotrophic factor expressing cells partially rescues the retina from damage due to acute high intraocular pressure” In Retinal Degenerative Diseases, J. D. Ash, C. Grimm, J. G. Hollyfield, R. E. Anderson, M. M. LaVail, C. B. Rickman, Eds. (Springer, 2014), pp. 837-843.

(2)Toshinori Fujie, Serge Ostrovidov, Samad Ahadian, S. Prakash Parthiban, Ali Khademhosseini, Hirokazu Kaji, “Bioinspired Muscle Tissue Devices” In Handbook of Biomimetics and Bioinspiration: 3 Volume Set, E. Jabbari, A. Khademhosseini, L. P. Lee, D.-H. Kim, A. Ghaemmaghami Eds. (World Scientific Publishing, 2014), pp. 969-984.

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

名称：薬剤徐放デバイス
発明者：梶 弘和，近藤太郎，ジャレ カシ
ユクリ ネジヤド，永井展裕，阿部俊明
権利者：国立大学法人東北大学
種類：特許
番号：特願 2015-110747
出願年月日：2015年5月29日
国内外の別：国内

名称：形状制御されたナノシート及びその製
造方法
発明者：岩瀬英治，新保創太，武岡真司，藤
枝俊宣，梶 弘和，阿部俊明
権利者：国立大学法人東北大学
種類：特許
番号：特願 2015-043990
出願年月日：2015年3月5日
国内外の別：国内

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶 弘和 (KAJI, HIROKAZU)
東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：70431525

(2) 連携研究者

石村 康生 (ISHIMURA, KOSEI)
独立行政法人宇宙航空研究開発機構・宇宙科
学研究所・准教授
研究者番号：10333626

藤枝 俊宣 (FUJIE, TOSHINORI)
早稲田大学・理工学術院・助教
研究者番号：70538735

長峯 邦明 (NAGAMINE, KUNIAKI)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：00551540