

令和元年6月3日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01387

研究課題名(和文) 脱細胞化組織を基盤とするソフトナノ粒子複合材料の開発と心筋梗塞治療への応用

研究課題名(英文) Development of soft nanoparticle composite materials based on decellularized tissues and its application to treatment of myocardial infarction

研究代表者

橋本 良秀 (HASHIMOTO, YOSHIHIDE)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：40638384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：界面活性剤および高静水圧(HHP)法によりブタ心筋、膀胱マトリクス(UBM)、小腸粘膜下組織(SIS)の脱細胞化に成功した。HHP法は、界面活性剤法に比べて、組織構造への影響が小さいことを明らかにした。ラット心筋梗塞モデルを用いて、in situゲル化によりナノゲル架橋ゲル単独あるいはナノゲル架橋ゲル/UBM-ECMハイドロゲル複合材の有用性について検討した結果、ナノゲル架橋ゲル/UBM-ECMハイドロゲル複合材処置群では、心筋の菲薄化および線維化が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で提案する脱細胞化組織-ナノゲル複合材料は、脱細胞化組織に存在する増殖因子などの薬物をナノゲルが取り込み、徐放するDDS機能と細胞の三次元足場として働く機能を有する。この材料は、心筋梗塞で心機能が低下した多くの患者のQOLの改善に役立つ可能性が期待できる。また、様々な組織の再生に応用可能であるばかりか、種々の幹細胞の機能制御に新たなツールを与え、iPS細胞などを用いた再生医療の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：we have developed decellularized porcine myocardium, bladder matrix (UBM), and small intestinal submucosa (SIS) by surfactant method and high-hydrostatic pressure (HHP) method. The tissue structure of decellularized tissue prepared by HHP method was maintained compared with surfactant method.

We have investigated the efficacy of nanogel-crosslinked gel or nanogel-crosslinked gel/UBM-ECM gel composite material using rat myocardial infarction model. As a result, it revealed that nanogel-crosslinked gel/UBM-ECM gel suppressed the myocardial thinning and fibrosis.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ナノゲル 脱細胞化生体組織 ECMハイドロゲル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、食生活の欧米化や人口の高齢化に伴い虚血性心疾患の罹患者が年々増加している。特に、心筋梗塞に代表される虚血性心疾患による死亡数は全死因の第2位を占めており、その抑止は喫緊の課題となっている。現在、心筋梗塞の治療には、ステントを用いた経皮的冠動脈形成術や血栓溶解剤による再灌流療法が行われている。しかしながら、梗塞巣の心機能は著しく失われており、血流を再開しても心機能は回復せず、それに加えて心筋が更に損傷してしまう虚血再灌流障害により慢性心不全に移行することが問題となっている。したがって、再灌流後に心筋組織で生じる虚血再灌流障害や、心筋の線維化を主体とする心筋リモデリングを抑制することができれば、梗塞後の心機能低下を最小限に留め、心不全への移行を抑制できると期待される。

最近、心筋由来の細胞外マトリクスをペプシン処理することで得られるハイドロゲルを FGF-2 や HGF などの細胞増殖因子とともに慢性期の梗塞心筋へ投与することで心筋リモデリングを抑制し、心機能を回復させる試みがなされている。投与初期ではハイドロゲル単独に比べ、心機能改善効果を示しているものの、長期では満足のいく結果は得られていないのが現状である。心筋リモデリングは慢性的な経過を辿るため、その抑制には持続的な薬効発現が求められるが、ゲル内部の不均一さに起因する初期の薬物の大量放出や内包された生理活性物質の変性や不可逆的な凝集により、活性を失うことが原因であると考えられる。

申請者らはこれまでに、肝臓由来の脱細胞化マトリクスを梗塞部位に塗布することで、心筋リモデリングを抑制できることを発見した。これらの結果は、脱細胞化マトリクス単独で心機能を回復させる可能性を示唆するものである。しかしながら、残存した心筋は極度に菲薄化しており、心筋リモデリングの抑制のみならず、心筋自体を修復させる新たな工夫が必要と考えられる。

そこで、タンパク質の凝集抑制能を有する疎水化多糖ナノゲルに着目した。ナノゲルは、親水性高分子である多糖に疎水基を部分的に導入した疎水化多糖が自己組織化することにより形成されるソフトナノ微粒子であり、内包したタンパク質の徐放制御が可能というユニークな特徴をもっている。申請者はこれまで、ナノゲルを集積したハイドロゲルを開発し、タンパク質の長期徐放担体や組織再生の足場材料として有用であることを報告している。

これらの背景をもとに、種々の脱細胞化マトリクスと機能性タンパク質を内包したナノゲルを複合化することにより、長期にわたる心筋リモデリングの抑制と心筋修復を誘導可能な新規システムを構築する研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、種々の脱細胞化組織を基盤材料として、ナノゲルを複合化した心筋組織の治療促進材料を開発し、心筋梗塞の新規治療システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 心筋修復に適した脱細胞化生体組織の探索

組織によって構成されるタンパク質やその微細構造は大きく異なるため、心筋修復に適した脱細胞化生体組織の部位探索を行なった。東京芝浦臓器株式会社よりブタ心臓、膀胱、小腸を購入し、筋膜、漿膜などの不要な組織を除去し、膀胱マトリクス(UBM)および小腸粘膜下組織(SIS)を得た。得られた種々の組織は界面活性剤法および高静水圧(HHP)法により脱細胞化処理を行なった。脱細胞化の評価はヘマトキシリン-エオジン(HE)染色、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)染色および PicoGreen 試薬を用いた DNA 定量を行った。

(2) 脱細胞化マトリクス上での細胞挙動

脱細胞化マトリクスゲルの毛細血管網誘導・形成能を調べるために、ラット脳微小血管由来内皮細胞を播種した。所定期間培養後、アクチン染色を行い、形成した血管網様構造を評価した。これらの結果をフィードバックすることにより心筋修復に適した脱細胞化生体組織を決定し、ラット心筋梗塞実験に用いた。

(3) アクリロイル基修飾疎水化多糖ナノゲルの合成

まず、Ar 雰囲気下にてコレステロールとヘキサメチレンジイソシアネートを反応させ、コレステリル N-(6-イソシアナトヘキシル)カルバメート (CHI) の合成を行なった。次に、プルランと合成した CHI を反応させ、コレステロール置換プルラン (CHP) を合成した。さらに、CHP と 2-アクリロイルオキシエチルイソシアネート (AOI) を反応させ、アクリロイル修飾疎水化多糖ナノゲル (CHPOA) を得た。種々の官能基の導入量は ¹H-NMR により算出した。

(4) ラット心筋梗塞モデルを用いた心筋リモデリング抑制効果の検討

麻酔下にて Wistar ラット (雄, 体重 250g) の肋間を切開し、心臓を露出した。左冠状動脈の起始部より心尖部に向かって約 2mm の位置を 5-0 プロリーンで結紮した。梗塞部位において疎水化多糖ナノゲル単独、脱細胞化生体組織/疎水化多糖ナノゲル複合材を in situ ゲル化させ固定化した。経時的に超音波エコーにより心筋の動きを観察した。所定期間後、安楽死させ、心臓を摘出した。心筋リモデリングの抑制効果を組織染色により評価した。

4. 研究成果

界面活性剤法および HHP 法を用いて、ブタ心筋、UBM、SIS の脱細胞化処理を行なった。得られた種々の組織の HE 染色結果より、いずれの処理においても細胞核が除去されていることが確認された。界面活性剤処理により脱細胞化した組織において、コラーゲン線維の断裂などが観察され、組織構造への影響が見られた。一方、HHP 法により脱細胞化した組織では、正常組織に類似しており、組織構造への影響は小さいことがわかった。また、PicoGreen を用いた DNA 定量結果から、組織 1mg 当たりの残存 dsDNA 量が 50ng 以下となり、Crapo らによって提唱されている脱細胞化の指標をクリアしていることがわかった。

種々の脱細胞化マトリクスゲル上に血管内皮細胞を播種し、所定期間培養後、アクチン染色により細胞の増殖と形態を観察した。HHP 法により作製した脱細胞化マトリクスゲル上では細胞の増殖はいずれの組織においても明らかな違いは観察されなかった。界面活性剤法により作製した脱細胞化マトリクスゲル上ではほとんど細胞接着は観察されなかった。コントロールとして用いたコラーゲンゲル上では、細胞凝集塊が形成後、凝集塊間においてチューブ様構造が形成した。一方、細胞外マトリクスゲル上では細胞凝集塊は形成されず、細胞間でチューブ様構造の形成が観察された。これらのチューブ様構造は培養日数の増加に伴い増加し、培養 5 日目において血管網様のネットワークが形成することが明らかとなった。さらに SIS 由来ハイドロゲルに比べ、UBM 由来ハイドロゲルの方がより網目の細かいネットワーク構造を形成していることが明らかとなった。以上のことから、脱細胞化 UBM の方が毛細血管の誘導能が高いことが示唆された。

次にラット心筋梗塞モデルを作製し、in situ ゲル化によりナノゲル架橋ゲル単独あるいはナノゲル架橋ゲル/UBM-ECM ハイドロゲル複合材の有用性について検討した。未処置群およびナノゲル架橋ゲル単独処置群では、心筋の菲薄化および線維化が観察された。一方、ナノゲル架橋ゲル/UBM-ECM ハイドロゲル複合材処置群では、心筋の菲薄化および線維化が抑制されることが明らかとなった (図 1)。

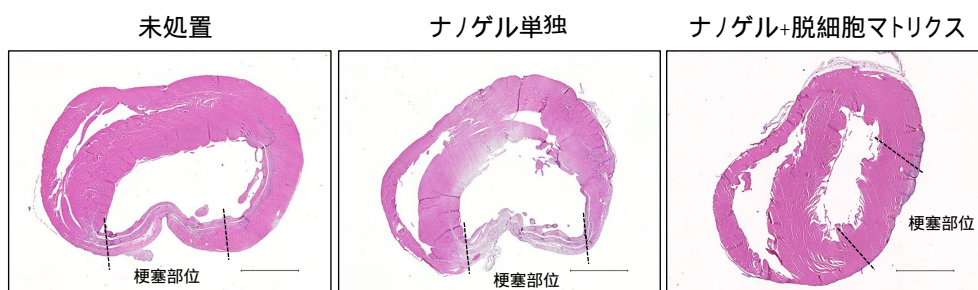


図 1 ラット心筋梗塞モデルによる機能評価

以上のことから、ナノゲルと脱細胞化生体組織を複合化した材料は、心筋梗塞治療への応用可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Yoshihide Hashimoto, Sada-atsu Mukai, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Nanogel tectonics for tissue engineering: Protein delivery systems with nanogel chaperones, *Adv Healthc Mater*, 2018; 7(23), e1800729.
- (2) Seiichi Funamoto, Yoshihide Hashimoto, Akio Kishida, Jun Negishi, A fibrin-coated pericardial extracellular matrix prevented heart adhesion in a rat model, *J Biomed Mater Res Part B*, 2018; 107(4), 1088-1094.
- (3) 山下暁立, 船本誠一, 張永巍, 橋本良秀, 岸田晶夫, 開心術後の癒着防止材の評価を目的とした心臓癒着動物モデルの構築および製品評価, *胸部外科*, 2018; 71(9), 658-663.
- (4) Yongwei Zhang, Takuya Iwata, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Pingli Wu, Naoko Nakamura,

- Yoshihide Hashimoto, Akio Kishida, Water absorption by decellularized dermis, *Heliyon*, 2018; 4(4): e00600.
- (5) Jun Negishi, Yoshihide Hashimoto, Akitatsu Yamashita, Yongwei Zhang, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Seiichi Funamoto, Evaluation of small-diameter vascular grafts reconstructed from decellularized aorta sheets, *J Biomed Mater Res Part A*, 2017; 105(5): 1293-1298.
 - (6) Gunce E Cinay, Pelin Erkoc, Mohammad Alipour, Yoshihide Hashimoto, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Seda Kizilel, Nanogel-integrated pH responsive composite hydrogels for controlled drug delivery, *ACS Biomater Sci Eng*, 2017; 3(3): 370-380.
 - (7) Jun Negishi, Yoshihide Hashimoto, Akitatsu Yamashita, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Seiichi Funamoto, Histological structure affects recellularization of decellularized arteries, *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl*, 2017; 70(Pt1): 450-455.

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 木村剛, 門田純平, 橋本良秀, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 種々の脱細胞化 ECM ゲルを用いた血管網構築, 第 18 回日本再生医療学会総会, 2019.3, 兵庫.
- (2) 橋本良秀, 山下暁立, 張永巍, 船本誠一, 岸田晶夫, ウシ血管を用いた脱細胞化小口径動脈グラフトの作製, 第 21 回日本異種移植研究会, 2019.2, 沖縄.
- (3) 橋本良秀, 組織再生プラットフォームとしての脱細胞化生体組織とその周辺技術, 医工連携セミナー, 2019.1, 東京.
- (4) 門田純平, 橋本良秀, 藤里俊哉, 木村剛, 岸田晶夫, 血管網構築を目指した脱細胞化 ECM ゲルの開発, 第 28 回インテリジェント・ナノ材料シンポジウム, 2019.1, 東京.
- (5) Junpei Kadota, Yoshihide Hashimoto, Toshiya Fujisato, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Characterization of ECM hydrogels prepared by different decellularization methods, 1st G'Lowing Polymer Symposium in KANTO, 2018.12, 東京.
- (6) 根岸淳, 橋本良秀, 張永巍, 山下暁立, 船本誠一, 岸田晶夫, フィブリン糊被覆脱細胞化心膜による心臓-胸壁間の癒着防止, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 2018.11, 兵庫.
- (7) 橋本良秀, 山下暁立, 張永巍, 船本誠一, 岸田晶夫, 脱細胞化小口径動脈グラフトの作製と in vivo 評価, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 2018.11, 兵庫.
- (8) 門田純平, 橋本良秀, 藤里俊哉, 木村剛, 岸田晶夫, 異なる脱細胞化方法で調製した ECM ヒドロゲルの特性評価, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 2018.11, 兵庫.
- (9) Junpei Kadota, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Preparation and characterization of ECM hydrogels derived from acellular urinary bladder matrix (UBM) and small intestinal submucosa (SIS), 3rd International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development (iLIM-3), 2018.9, Tokyo.
- (10) Junpei Kadota, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, In vitro microvascular network formation in/on hydrogels derived from decellularized tissues, *Frontier* 2018, 2018.9, lausanne, Switzerland.
- (11) Junpei Kadota, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Preparation and characterization of hydrogels derived from decellularized urinary bladder matrix (UBM) and small intestinal submucosa (SIS), 5Th TERMIS World Congress, 2018.9, Kyoto.
- (12) 橋本良秀, 人工角膜の最前線, 2018 年度サイエンスカフェ(最新医歯学研究), 2018.7, 東京.
- (13) 橋本良秀, ソフトナノ粒子の集積化による再生医療用材料の開発, 日本真空学会 機能薄膜部会 ナノ構造機能創成専門部会 第 8 回研究会, 2017.11, 東京.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(1) <http://www.labonet.info/kishida/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：根岸淳

ローマ字氏名：Negishi Jun

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院繊維学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：60722634

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：船本誠一

ローマ字氏名：Funamoto Seiichi

研究協力者氏名：山下暁立

ローマ字氏名：Yamashita Akitatsu

研究協力者氏名：秋吉一成

ローマ字氏名：Akiyoshi Kazunari

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。