

令和元年5月30日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05923

研究課題名(和文) 低侵襲投与が可能な高分子材料と細胞の相互作用による腎臓再生デバイスの創製

研究課題名(英文) Creation of Kidney regeneration device capable of minimally invasive administration by interaction between cells and polymer material

研究代表者

堀 秀生 (Hori, Hideo)

藤田医科大学・保健学研究科・講師

研究者番号：00342113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高分子材料と細胞との相互作用を利用した腎臓再生デバイスを創製するために、内視鏡手術を想定した細胞捕捉不織布とカテーテルによる投与を想定した細胞/高分子材料粉体混合物を検討した。1)細胞捕捉不織布では肝細胞増殖因子(HGF)の産生が亢進したが、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の産生は抑制された。キトサンナノファイバー不織布が最もHGFの産生能が高かった。2)細胞/粉体混合物では粉体量と細胞数を最適化することによってHGFとVEGFの産生が亢進した。以上のことから細胞と高分子材料との相互作用により産生が促進された成長因子により障害腎臓を改善する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性透析患者数は33万人を超えており、透析医療費の増大は医療経済からも大きな問題である。また、食事制限などによる患者のQOLの低下や、週3回の通院が必要で、高齢により自力通院ができない患者の送迎の問題などが課題である。本研究での成果をもとに臨床応用に発展すれば、末期腎不全患者の血液透析への導入の回避が可能となる。よって、現在課題となっている問題点の改善が期待できる。また、この技術を応用すれば、他の臓器の再生医療にもつながる。

研究成果の概要(英文)：To create a kidney regeneration device that utilizes the interaction between a polymer material and cells, the combination of the cells and polymer material powder that assumes administration using catheter and the cells captured nonwoven filter device that assumes endoscopic surgery were investigated.

1) The cells captured nonwoven filter enhanced the production of hepatocyte growth factor (HGF) but suppressed the production of vascular endothelial growth factor (VEGF). The cells on chitosan nanofiber nonwoven filter had the highest ability to produce HGF. 2) In the combination of the cells and polymer material powder, the production of HGF and VEGF were enhanced by optimizing the powder amount and cell number. These results suggest that growth factors released from cells on the device may treat injured kidneys.

研究分野：医薬医療分野(医療機器、再生医療、血液浄化)

キーワード：再生医療 腎臓 幹細胞 不織布 高分子材料粉体 成長因子

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

1. 研究開始当初の背景

(1)本研究者らは、よりよい血液透析をめざして、人工透析のトータルシステムの改良について研究を行ってきた。しかしながら、血液透析を行う限り大幅な QOL の改善は難しく、なんとか患者の苦しみを軽減するため、透析回避・離脱を実現できる治療デバイスの創製を目指している。

(2)研究開始当初の腎臓再生治療に関する動向と本応募の基礎となる治療システムの概要：

- ・血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) および肝細胞増殖因子 (HGF) は腎臓の再生に重要な因子であり、これらの因子の静脈内投与は慢性腎不全モデル動物の障害腎を改善することが報告されている。しかしながら、適切な濃度で適切な時点で成長因子を供給することは困難である。また、間葉系幹細胞の静脈内投与も試みられているが、十分量の細胞が腎臓まで到達しないことが課題である。

- ・不織布は白血球除去に広く使用され、輸血後移植片宿主病の防止や潰瘍性大腸炎の治療に用いられている。

- ・本研究者らは、障害腎臓の局所化のツールとして不織布を使用し、細胞を捕捉した不織布を障害腎臓へ留置することにより細胞から放出される成長因子により慢性腎臓病を治療できるのではないかと着想した。

- ・本研究開始時点までに得た研究成果

 - 不織布に捕捉された細胞の成長因子産生能

不織布材料を用いた細胞捕捉デバイスを用いて腎臓を再生する検討を進めてきた。これまでの研究で、ポリ乳酸(PLA)製不織布の繊維径を 3 μ m 以下にして、かつ、積層枚数を増やすことで、末梢血細胞や間葉系幹細胞を高効率に捕捉することを見出した。さらに、ヒト末梢血細胞および脂肪由来間葉系幹細胞を捕捉した PLA 製不織布を培養すると腎臓再生関連成長因子の一つである血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生が素材依存性に亢進することを確認した。つまり、適切な足場に捕捉された細胞と、足場材料との相互作用により、成長因子の産生能が亢進されたと考えられる。

 - 細胞捕捉不織布の皮膚再生促進効果

生分解性不織布の PLA に、自己末梢血中の白血球および血小板を濾過吸着させ、糖尿病モデルマウスの創傷部位に貼付することで、他の素材の不織布にはない治癒促進効果を見出した。

 - 腎不全動物での細胞捕捉不織布の効果

慢性腎不全モデルラットの腎被膜下に、ラット骨髓由来間葉系幹細胞捕捉 PLA 不織布を貼付して、幹細胞を障害腎近傍にとどめた結果、糸球体硬化性病変の発症が抑制された。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果をもとに、臨床現場で使いやすい内視鏡やカテーテルを用いて対象組織に注入可能なデバイスを創製する(図1)。具体的な研究項目は、(1)ナノファイバーあるいは不織布に細胞を捕捉させたデバイスの創製、(2)粉体と細胞を混和した流体注入デバイスの創製、(3)様々な素材、細胞を組み合わせた複合デバイスの創製の3つである。

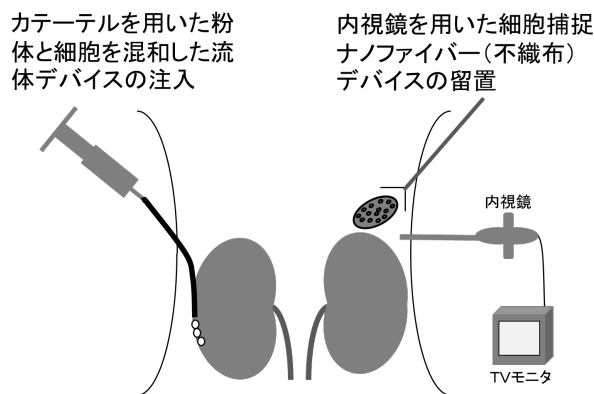


図1 本研究の治療概念図

(1)ナノファイバーあるいは不織布に細胞を捕捉させたデバイスの創製

不織布素材、繊維径、積層枚数、繊維密度、形状などを検討し、VEGF、HGF の産生能を指標とした細胞捕捉不織布デバイスを構築する。

(2)粉体と細胞を混和した流体注入デバイスの創製

粉体素材、粉体量、細胞量などを検討し、VEGF、HGF の産生能を指標とした細胞捕捉不織布デバイスを構築する。

(3)様々な素材、細胞を組み合わせた複合デバイスの創製

(1)、(2)で構築したデバイスを組み合わせ、VEGF、HGF の産生能を指標とした細胞捕捉不織布デバイスを構築する。

3. 研究の方法

(1) 腎臓再生デバイスの構築

細胞捕捉不織布デバイスの構築

不織布として PLA(旭化成)キチン(ベスキチン®、ニプロ)キトサンナノファイバー(CNF、シンワ)を用いた。CNF 不織布は PLA 不織布(繊維径 18-22 μm)の支持層体に CNF を積層した構造である。(図 2)。各不織布の物性値を表 1 に示す。各不織布を積層し、濾過滅菌用フィルタを用いて間葉系幹細胞を濾過し、濾過前後の細胞数を計測し、細胞捕捉率を算出した(図 3)。

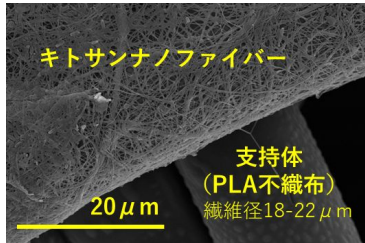


図 2 CNF 不織布の電子顕微鏡像

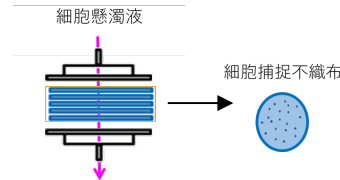


図 3 細胞捕捉不織布

表 1 不織布の物性値

不織布素材	繊維密度	繊維径
PLA	33g/m ²	1.8 μm
キチン	30g/m ²	8 μm
CNF	0.2g/m ²	50-500nm
	0.5g/m ²	50-500nm
	1g/m ²	50-500nm

細胞と高分子材料粉体との混合物の構築

高分子材料粉体としてキチン粉体(富士フィルム和光)PLA 不織布粉体を用いた。PLA 不織布粉体は冷凍粉碎機(吉田製作)にて粉碎した。粉体は Cell Sens Standard(オリンパス)を用いて投影面積を計測した。粉体は細胞懸濁液と混和し、混合物とした。

(2)細胞捕捉不織布デバイスの成長因子産生能

細胞

ラット骨髄由来間葉系幹細胞(r-BMSC、コスモバイオ)ラット脂肪由来間葉系幹細胞(r-ADSC、コスモバイオ)ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(h-BMSC、LONZA)ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(h-ADSC、LONZA)を評価した。

成長因子産生能の評価法

細胞懸濁液(8 × 10⁴ cells/mL)を不織布に濾過し(図 3)細胞を捕捉した不織布をシャーレ上で培養し、培養液中の VEGF、HGF を測定した。細胞のみ培養したものをコントロールとした。

(3)細胞/高分子材料粉体との混合物の成長因子産生能の評価

細胞

r-BMSC、r-ADSC を評価した。

成長因子産生能の評価

10⁴ cells の細胞に対して高分子材料粉体を 0.25、0.5、1.0、1.5mg 混和し、細胞のみを培養したものをコントロールとした。細胞/高分子材料粉体の混合物を培養し、培養上清中の VEGF、HGF を測定した。

(4)複合デバイス(細胞/高分子材料粉体と不織布の組み合わせ)の成長因子産生能の評価

10⁴ cells の r-BMSC に対してキチン粉体を 0.5mg 混和し細胞懸濁液(8 × 10⁴ cells/mL)を作製した。細胞懸濁液を不織布に濾過し(図 3)細胞と粉体を捕捉した不織布をシャーレ上で培養し、培養液中の VEGF、HGF を測定した。

(5)腎臓再生デバイスの留置法の検討

すべての動物実験は藤田医科大学動物実験委員会の承認後に実施した。

細胞捕捉不織布デバイス

不織布は PLA 不織布、キチン不織布、CNF 不織布を用い、不織布直径 13mm、25mm のデバイスを検討した。イソフルラン麻酔下で、SD ラット(日本チャールズリバー)の腎臓被膜を剥離し、細胞捕捉不織布デバイスを貼付した。

細胞/高分子材料粉体混合物

高分子材料粉体としてキチン粉体、PLA 不織布粉体を用いた。細胞/高分子材料粉体混合物はリン酸緩衝液(PBS)あるいは、コラーゲン(新田ゼラチン)で混和した。イソフルラン麻酔下で、SD ラット(日本チャールズリバー)の腎臓被膜下へ 1mL シリンジを用いて細胞/高分子材料粉体混合物を 1mL 注入した。

4. 研究成果

(1) 細胞捕捉不織布デバイス

細胞捕捉不織布のラット間葉系幹細胞(r-MSC)捕捉率の比較

r-BMSC 捕捉不織布デバイスを走査型電子顕微鏡(日立)で観察した(図 4)。PLA 不織布およびキチン不織布では、細胞が繊維へ接着しており、CNF 不織布では細胞はナノファイバーに捕捉

されていた。CNF 不織布における r-BMSC 捕捉率を表 2 に示す。繊維密度 0.5g/m² および 1g/m² の CNF 不織布はフィルターホルダー接続部からの漏れが生じ、積層枚数を増やすことができなかった。CNF 不織布では細胞が繊維に捕捉されているため、繊維密度が高い CNF 不織布では細胞の詰まりによりフィルターホルダーの接続部より漏れが生じたと考えられた。繊維密度 0.2g/m² の CNF 不織布を 5 枚積層したデバイスが最も捕捉率が高かった。各デバイスの細胞捕捉率を表 3 に示す。繊維径が細いほど細胞捕捉率が高くなることはこれまでの研究で明らかとなっているが、繊維径 8 μm と PLA 不織布と比べ太い繊維径であるキチン不織布も積層枚数を増やすことによって 80%以上の細胞捕捉率が得られた。r-BMSC に比し、r-AMSC の方が細胞捕捉率は高かった。

h-BMSC および h-ADSC については PLA 不織布、CNF 不織布ともに 90%以上の捕捉率であった。

表 2 CNF 不織布における r-BMSC 捕捉率

繊維密度	積層枚数				
	2枚	3枚	4枚	5枚	6枚
0.2g/m ²	30.8 ± 13.7%	48.2 ± 18.4%	64.6 ± 27.7%	94.4 ± 3.5%	87.6 ± 5.7% [†]
0.5g/m ²	9.9 ± 8.5%	31.6 ± 0.6% [†]	—	—	—
1g/m ²	72.5 ± 20.3% [†]	—	—	—	—

[†]: フィルタから漏れあり

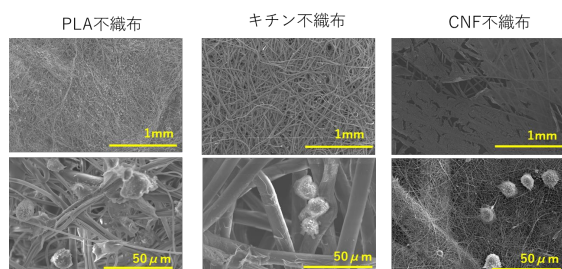


図 4 r-BMSC 捕捉不織布の電子顕微鏡像

表 3 細胞捕捉不織布デバイスの捕捉率

素材	繊維径	積層枚数	r-BMSC捕捉率 (%)	r-ADSC捕捉率 (%)
PLA	1.8 μm	2	91.4 ± 5.0	98.7 ± 11.0
キチン	8 μm	6	81.7 ± 12.1	92.6 ± 5.7
CNF	50-500nm	5	94.4 ± 3.5	92.7 ± 4.5

細胞捕捉不織布デバイスの成長因子産生能

r-BMSC と r-ADSC の成長因子産生能を図 5 に示す。キチン不織布以外のデバイスは HGF の産生能が亢進した。HGF の産生能は CNF 不織布、PLA 不織布、キチン不織布の順であった。繊維径が細いほど、HGF の産生能が促進することが示唆された。一方、VEGF はすべての不織布において産生が抑制された。

ヒトの間葉系幹細胞の場合、h-ADSC 捕捉 PLA 不織布で HGF の産生能が亢進した。

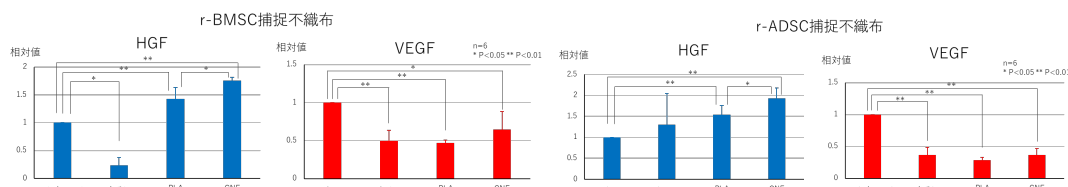


図 5 r-MSC 捕捉不織布の成長因子産生能

(2) 細胞/高分子材料粉体混合物

PLA 不織布粉体とキチン粉体の投影面積はそれぞれ 201.1 ± 380.2 μm²、232.5 ± 613.6 μm² であった。細胞/高分子材料粉体混合物を走査型電子顕微鏡で観察したところ、不織布と同様に粉体へ細胞が接着していた (図 6)。

r-MSC/PLA 不織布粉体混合物の成長因子産生能を図 7 に示す。r-BMSC、r-ADSC とともに 0.25mg/10⁴cells が最も HGF と VEGF の産生が亢進した。粉体量を増やすことによって成長因子の産生能は抑制された。

r-MSC/キチン粉体混合物の成長因子産生能を図 8 に示す。r-BMSC、r-ADSC とともに 0.5mg/10⁴cells 以上で HGF と VEGF の産生が亢進した。細胞捕捉不織布デバイスでは HGF の産生促進のみであったが、粉体材料では粉体量と細胞数を最適化することによって HGF と VEGF の産生がともに亢進した。同じ素材でも形状により成長因子の産生能をコントロールできることが示唆された。

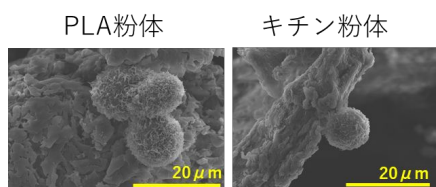


図 6 r-BMSC/高分子材料粉体の電子顕微鏡像

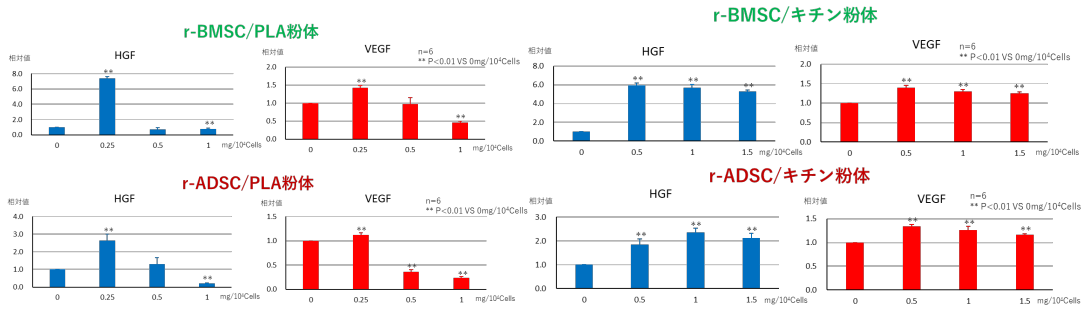


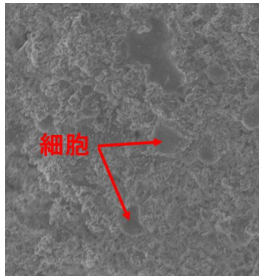
図7 r-BMSC/PLA 不織布粉体の成長因子産生能

図8 r-BMSC/キチン粉体の成長因子産生能

(3) 複合デバイス

細胞捕捉が良い PLA 不織布と素材の異なるキチン粉体で複合デバイスを構築した。複合デバイスの電子顕微鏡像を図9に示す。積層1枚目のPLA不織布にほとんどの粉体が捕捉されており、2枚目以降のPLA不織布の粉体はわずかであった。細胞は粉体に接着している細胞と不織布繊維に接着している細胞が観察された。r-BMSC 複合デバイスと r-BMSC/キチン粉体と r-BMSC 捕捉 PLA 不織布の成長因子産生能を比較した。r-BMSC 複合デバイスと r-BMSC 捕捉 PLA 不織布は同程度の成長因子産生能であった。r-BMSC/キチン粉体混合物が HGF、VEGF とともに最も高値を示した(図10)。

積層1枚目のPLA不織布



積層2枚目のPLA不織布

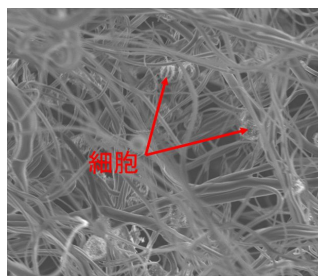


図9 r-BMSC/キチン粉体捕捉 PLA 不織布デバイスの電子顕微鏡像(倍率500倍)

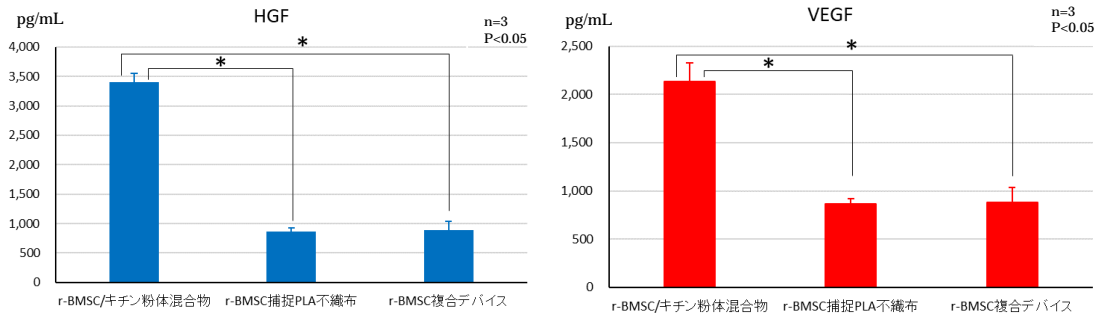


図10 r-BMSC 複合デバイスの成長因子産生能

(4) 腎臓再生デバイスの留置法

細胞捕捉不織布デバイス

不織布直径 25mm の細胞捕捉不織布デバイスでは腎臓被膜下へ貼付しただけでは腎臓への留置は困難であり、周囲組織へ縫合糸を用いて固定する必要があった。一方、不織布直径 13mm の細胞捕捉不織布デバイスは腎臓被膜下への貼付のみでデバイスの留置が可能であった。ただし、不織布の積層枚数は6枚までが限度であった。

細胞/高分子材料混合物

細胞/高分子材料混合物を PBS で混和した場合、腎臓被膜下より注入時に漏れてしまい留置が困難であった。コラーゲンで固形化した細胞/高分子材料混合物は留置が可能であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Hideo Hori, Masanori Shinzato, Yoshiyuki Hiki, Shigeru Nakai, Gen Niimi, Shizuko Nagao, Nobuya Kitaguchi. Combination of Nonwoven Filters and Mesenchymal Stem Cells Reduced Glomerulosclerotic Lesions in Rat Chronic Kidney Disease Models. International Journal of Clinical Medicine, 10, 135-149. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

堀秀生, 新里昌功, 新美元, 長尾静子, 比企能之, 北口暢哉、組織再生促進デバイス：細胞と不織布粉体との混合物による成長因子産生能の検討、第54回日本人工臓器学会大会、2016年11月25日、米子

堀秀生、望月優一、滝沢佑佳、大阪谷錬、吉田絢美、井手富彦、新美元、新里昌功、長尾静子、北口暢哉、細胞と不織布の相互作用による間葉系幹細胞の成長因子産生促進効果、第17回日本再生医療学会、2018年3月23日、横浜

堀秀生、磯貝隆稀、後藤真奈美、中山琴瑛、竹下貴斗、新里昌功、北口暢哉、細胞と材料の相互作用による再生促進デバイスの創製：材料の形状により成長因子産生能が異なる、第18回日本再生医療学会、2019年3月23日、神戸

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：北口暢哉

ローマ字氏名：Kitaguchi Nobuya

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医療科学部 臨床工学科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70508077

研究分担者氏名：新里昌功

ローマ字氏名：SHINZATO, Masanori

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医療科学部 医療経営情報学科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80148288