

令和元年6月28日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10645

研究課題名(和文)慢性心筋虚血に対する温度感応ゲル化ポリマーを担体とした脂肪細胞組織由来幹細胞治療

研究課題名(英文) Treatment for chronic ischemic myocardium using adipose tissue derived stromal cell incorporated in the biodegradable injectable polymer exhibiting temperature-responsive sol-to-gel transition

研究代表者

打田 裕明(Uchida, Hiroaki)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：70736834

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)：梗塞に陥った心筋に脂肪細胞由来間葉系幹細胞(AdSC)を注入して心機能を改善させる試みがなされているが、より良い効果を得るためにはAdSC生着の改善が必要である。AdSCの増殖かつ血管新生タンパク分泌が可能であるポリマー(体温で液状からゲル化するため組織注入と定着が可能)の作成に成功した。このAdSC含有ポリマーをマウス梗塞心筋に注入したところ、AdSC生着、毛細血管密度、そして心機能のより良い改善が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児領域の冠動脈狭窄および閉塞病変に対する血行再建に成人で確立された治療の適用は困難であるため、傷害心筋での血管再生を直接誘導する必要がある。本研究はその直接的治療を探索するTranslational researchである。AdSCの局所投与に有効なデリバリー法の抽出を医工連携研究から可能とした。各構成要素の最適化と規格化、そして生物学的安全性の検証を加えることで臨床応用への展開が可能である。

研究成果の概要(英文)：Coronary artery revascularization established in adults, such as catheter intervention and bypass-grafting, is not a choice in pediatric ischemic heart disease because of small size and diffuse lesion. Vascular regeneration induced directly in the ischemic myocardium could be an alternative therapy in pediatric patients. Although myocardial injection of adipose tissue derived stromal cells (AdSCs) has been known as a possible treatment of experimental myocardial infarction, it is still unknown the ideal delivery method for better AdSCs survival. We developed the biodegradable injectable polymer exhibiting temperature-responsive irreversible sol-to-gel transition where AdSCs could grow and secrete vascular growth factors. After the AdSCs suspended in the polymer were directly injected into the murine infarcted myocardium, the density of newly developed capillary vessels, survival rate of AdSCs, and recovery of cardiac function were greater than those after the injection of AdSC alone.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：サイトカイン 血管新生因子 温度応答型生分解性ポリマー ソルーゲル転移 脂肪由来幹細胞 細胞
内包ポリマー 慢性心筋虚血

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児領域では治療対象冠動脈の血管径が微小でありカテーテル治療と外科手術操作が困難であること、使用できるバイパスグラフトが限られること、および成長によるサイズアップが必要であること等を理由に成人で確立された冠動脈へのカテーテル治療や直達治療は行われることは少ない。

(2) カテーテル治療と直達外科手術方法の代替として新生血管を心筋内に誘導して虚血を改善する治療法の開発の発想に至った。

(3)安全かつ効果的採取が可能な脂肪由来間葉系幹細胞 (AdSC) を用い、虚血心筋領域への新生血管による側副血行の増加を促進させる、上記細胞を安定的に局所に留めるために新しく開発された生体適合性のある吸収性ポリマーを応用する、を組み合わせる。

2. 研究の目的

独自に開発したインジェクタブルポリマー(IP: 室温と体温の間でゾル-ゲルに転移し、かつ生分解するポリマーであり、注射により組織に容易に直接注入が可能で、組織内で速やかにゲル化する)に AdSC を懸濁させ心筋内に局所注入することで、傷害心筋への治療効果を検証することである。すなわち3段階の *in vitro*、*in vivo* での検証である。

(1) IP ゾルおよびゲル中での AdSC の生存と増殖

(2) IP ゲル内に浮遊した状態の AdSC からの血管内皮増殖因子(VEGF)からの分泌

(3) マウスに作成した梗塞心筋に IP ゲル内に浮遊させた AdSC の心筋局所投与による効果

3. 研究の方法

(1)AdSC 培養液に各種ポリマーを溶解して調製したゾル状 IP と AdSC の懸濁液を混合し、37 に加温して IP をゲル化させ培養を継続する。一定期間ののちに PBS による希釈と物理的粉碎によりゲルを崩壊させて細胞を分離し、Live/Dead assay で細胞の生存率を測定する。

(2)(1)と同様に A ゲル化 IP 内で AdSC を一定期間培養した後に培養上清を回収し、VEGF の産生を RT-PCR 法および ELISA 法で定量する。

(3)C57BL/6 マウスの冠動脈左前下行枝を結紮する心筋梗塞モデルを作製し、結紮直後に 20 万個の AdSC を浮遊させたゾル状 IP 製剤 20 μ L を虚血心筋領域に刺入する。注入後 28 日に犠牲死させ摘出心臓から組織切片を作製し、梗塞巣での毛細血管密度と AdSC の残存数を測定する。

4. 研究成果

(1)カプロラクトン-グリコール酸共重合体

(PCGA)とポリエチレングリコール(PEG)から成るトリブロック共重合体(tri-PCG)をポリマー基本骨格し、tri-PCG にアクリル基を導入したポリマー(tri-PCG-Acryl)ミセルと tri-PCG に脂溶性 6 官能ポリチオールを内包した (tri-PCG -DPMP) ミセルを混合した IP 注射用ポリマー溶液を作成した。(図 1)

tri-PCG のみを物理的架橋した IP ゲル、そして tri-PCG-Acryl (全ポリマーの 25%) および当量

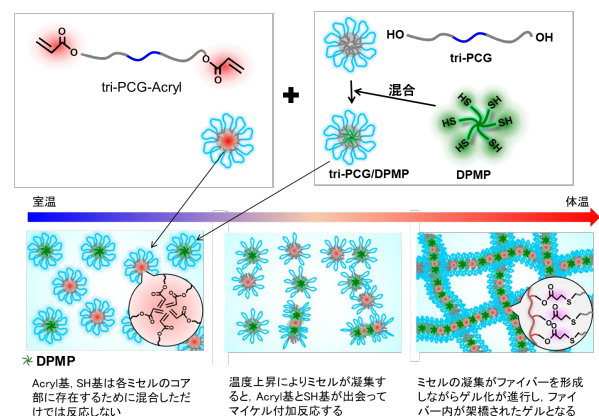


図1 温度にตอบสนองして化学架橋ゲルを形成するIPの模式図

の tri-PCG -DPMP を化学的架橋させた IP ゲルのそれぞれで AdSC を培養し生存率を比較した

(図 2)

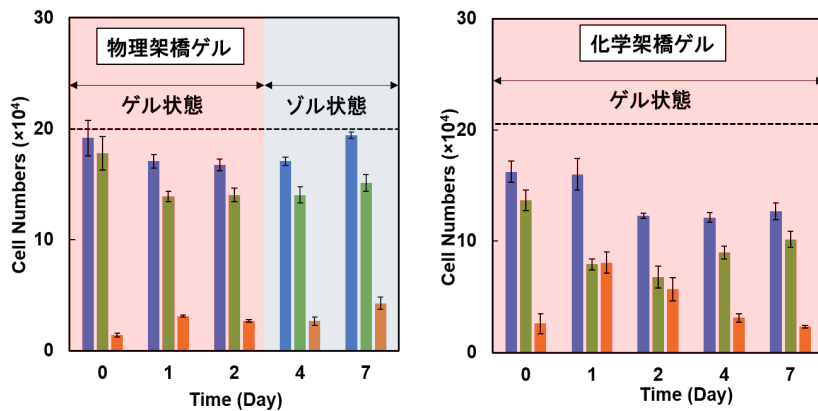


図 2 IPハイドロゲル中で培養した脂肪由来幹細胞の細胞数
 ■全細胞数(生細胞数+死細胞数) ■生細胞数 ■死細胞数

前者の物理架橋 IP ではゲルが 2 日後にはゾル状に戻ったが、ゲル化直後の培養開始 1 日で得た 80% 以上の細胞の生存がゾル化後も維持されていた。IP のゾル-ゲル転移現象が細胞の生死に有意な影響を与えなかった。一方、化学架橋 IP では全経過期間 (7 日) でゲル状態が維持され、1 日後に半分程度まで減少した生細胞数は 7 日目まで漸増回復傾向を示した。ゲル内での AdSC の増殖が可能であることを確認した。

(2)IP ゲル内で培養された AdSC の VEGF 遺伝子発現の PCR による比較定量と上清における VEGF 分泌量を定量した (図 3)

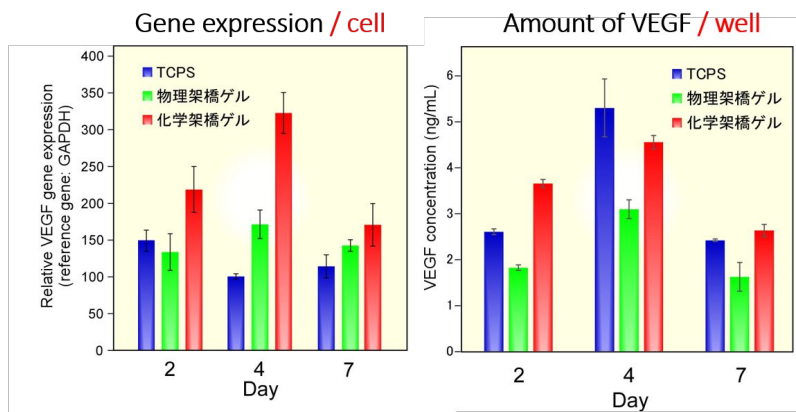


図3 IPハイドロゲル中で培養した脂肪由来幹細胞のVEGF産生。左:RT-PCRを用いた1細胞当たりの産生量, 右:ELISAによるwell当たりの産生量
 TCPS:細胞培養用ポリスチレン器材

細胞あたりの VEGF 遺伝子発現と well あたりの VEGF 分泌量はともに物理架橋ゲル内で培養した場合と比較して化学架橋ゲル内で培養した場合の方が高値であった。加えて化学架橋ゲルのサンプルでは、より多い細胞数が着着したポリスチレン製の培養器材でのサンプルに匹敵する VEGF 分泌量であった。この結果から IP ゲル内で AdSC を培養しても VEGF を産生する活性を保持していることが確認された。

(3)マウスの心筋梗塞部位に各種の注入を行い、28 日後に摘出した心臓の梗塞部位での新生毛細血管を免疫染色し組織学的に定量した(図 4)。ここでは長期間にゲル化を保持する化学的架橋

IP を選択した。化学架橋 IP ゲル+AdSC 投与群では、化学架橋 IP ゲルの単独注入群および AdSC の単独投与群に比較し、梗塞部位近辺の毛細血管密度が高かった。また梗塞心筋内での AdSC の残存は化学架橋 IP ゲルを併用することで各段に良好となっていた。さらに心臓超音波検査による左心室機能評価において化学架橋 IP ゲル+AdSC 投与群で心機能の改善が認められた。以上の結果より、化学架橋型 IP ゲルは AdSC の局所デリバリーと生着および機能の維持に有効であることが梗塞心筋で示された。

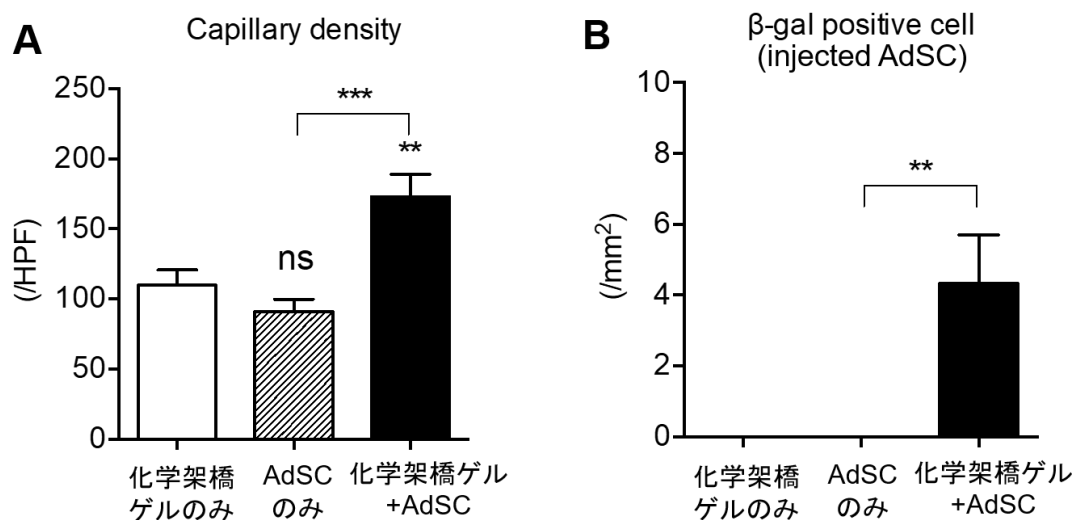


図4 (A) 心筋梗塞モデル作製28日後の梗塞部位における毛細血管密度。(B) 単位面積あたりの β -galactosidase発現細胞数(移植されたAdSC数)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yoshida Yasuyuki, Kawahara Keisuke, Inamoto Kenta, Mitsumune Shintaro, Ichikawa Shinya, Kuzuya Akinori, Ohya Yuichi, Biodegradable Injectable Polymer Systems Exhibiting Temperature-Responsive Irreversible Solto-Gel Transition by Covalent Bond Formation, ACS Biomaterials Science & Engineering, 査読有、3 巻、2017、56-67
DOI: 10.1021/acsbomaterials.6b00581

Yoshida Yasuyuki, Kawahara Keisuke, Mitsumune Shintaro, Kuzuya Akinori, Ohya Yuichi, Injectable and biodegradable temperature-responsive mixed polymer systems providing variable gel-forming pH regions, 査読有、28 巻、2017、1158-1171
DOI: 10.1080/09205063.2017.1304170

〔学会発表〕(計 26 件)

Y. Ohya, Y. Yoshizaki, T. Nagata, H. Takai, Y. Yoshida, K. Takata, A. Kuzuya, Biodegradable Irreversible Thermo-gelling Polymer Systems for Drug Delivery and Other Medical Applications, ACS National Meeting & Exposition, USA (国際学会), 2019

M. Ii, Y. Yoshizaki, H. Takai, A. Kuzuya, Y. Ohya, H. Uchida, S. Nemoto, Adipose-derived Stem Cell Therapy with Temperature-sensitive Biodegradable Injectable Gel for Myocardial Infarction, 第 83 回日本循環器学会学術集会、2019
能崎優太, 高井宏樹, 藤原壮一郎, 伊井正明, 打田裕明, 根本慎太郎, 葛谷明紀, 大矢裕一, 虚血性心疾患に対する温度応答型生分解性インジェクタブルゲルを用いた脂肪由来幹細胞デリバリー, 第 18 回日本再生医療学会総会、2019

Y. Yoshizaki, H. Takai, S. Fujiwara, M. Ii, H. Uchida, S. Nemoto, A. Kuzuya, Y. Ohya, Cellular Delivery System Using Temperature-responsive Biodegradable Injectable Hydrogels for Ischemic Heart Diseases, KUMP International Symposium, Osaka (国際学会), 2019

Y. Ohya, Y. Yoshida, K. Kawahara, K. Takada, T. Nagata, H. Takai, Y. Yoshizaki, A. Kuzuya, Biodegradable Injectable Thermo-gelling Polymer Systems with Longer and Controllable Duration Time of Gel State, Society for Biomaterials 2018 Annual Meeting and Exposition, USA, 2018

大矢裕一, 温度応答型生分解性インジェクタブルポリマーの開発, 第 67 回高分子討論会(招

待講演) 2018

大矢裕一, 高井宏樹, 吉田泰之, 葛谷明紀, 伊井正明、細胞デリバリーを意図した温度応答型生分解性インジェクタブルゲル内での脂肪由来幹細胞培養、第16回日本再生医療学会総会、2016

〔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

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/tho/guide/kenkyu/index.html>

http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/kinosei/re_theme.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：大矢 裕一

ローマ字氏名：OHYA,YUICHI

所属研究機関名：関西大学

部局名：化学生命工学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：10213886

研究分担者氏名：伊井 正明

ローマ字氏名：II,MASAAKI

所属研究機関名：大阪医科大学、

部局名：研究支援センター

職名：講師

研究者番号(8桁)：10442922

研究分担者氏名：根本 慎太郎

ローマ字氏名：NEMOTO,SHINTARO

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：20237811

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：永塚 健宏

ローマ字氏名：NAGATSUKA,TAKEHIRO

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。