

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19938

研究課題名（和文）酸素産生ナノ粒子を用いた革新的細胞組織移植法の確立

研究課題名（英文）Innovative cell transplantation method using nanoparticles

研究代表者

長瀬 健一（Nagase, Kenichi）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・准教授

研究者番号：10439838

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(PLGA)という生体内で分解する材料を原料としたナノ粒子の開発をおこなった。電圧をかけながら、原料の溶液を噴射する粒子の作製方法（エレクトロスプレー法）を用いて、電圧や原料溶液の組成を調節することで、ナノ粒子の形状、粒子径、生体条件での分解速度を制御することが可能となった。開発したナノ粒子を細胞と一緒に移植することで、移植した細胞の機能を改善できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で開発したナノ粒子は、細胞を移植して疾病を治療する再生医療において、疾患部位に移植した細胞の生存率、活性を向上できる可能性がある。これにより、再生医療の治療効果の向上、および、その適用範囲を大幅に拡大できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we developed nano-particles composed of polylactic acid-polyglycolic acid (PLGA) were developed. Electrospray method was used for preparation of nano-particles. Diameter, and configuration of nanoparticles were modulated by changing the applied voltage and composition of PLGA solution. The developed nanoparticles have potency for increased cellular function after transplantation with cellular tissue.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：バイオマテリアル 再生医療 組織工学 DDS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体が本来有する治癒能力を最大限に引き出す再生医療が新たな治療方法として注目を集めている。また近年では組織工学の発展に伴い、細胞から *in vitro* で作製した細胞組織を生体内に移植して治療を行う細胞移植療法が検討されており、治療効果を有する細胞から作製した細胞凝集塊(スフェロイド)や細胞シートを移植する新たな治療方法が行われている。これらの細胞移植療法において、移植した細胞が移植部位に生着し、効果的に作用することが重要であるが、心筋細胞や肝細胞などの代謝活性の高い細胞から作製された細胞組織の場合は、疾患部位に移植すると同時に細胞組織内部に十分な酸素が行き渡らず壊死を起こしてしまう。これにより、移植細胞の大半が生体内に生着しないため、移植細胞の十分な治療効果が得られていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、細胞組織に付着させて体内に移植することで、細胞の生着を促すマイクロ～ナノメートルオーダーの微小粒子を開発する。移植と同時に移植組織近傍で徐々に分解し、内包物を細胞組織付近で作用させることで、細胞の活性を高めるナノ粒子を作製する。これにより、移植細胞の生存率、機能を向上させることで、再生医療の治療効果の向上、および、その適用範囲を大幅に拡大できる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(PLGA, 共重合比 1:1)を用いたナノ粒子を作製した。PLGA をアセトン:エタノール=9:1の混合溶媒に、40℃で加熱しながら攪拌し、PLGA 溶液を作製した。またモデル内包物として、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)等を用いた。bFGF の水溶液を作製し、PLGA 溶液に混合分散させた。作製したエマルションをシリンジに入れ、エレクトロスプレー法を用いて、噴射ターゲットのアルミホイルに電圧を印加して噴射し、ナノ粒子を作製した(図 1)。作製したナノ粒子の形状は、電界放出型走査電子顕微鏡(FE-SEM)により観察した。ナノ粒子からの内包物の放出挙動は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に浸漬させ、PBS に溶出した内包物の経時濃度変化を測定することで算出した。移植する細胞組織のモデルとして肝臓の細胞を用いた細胞組織を作製した。ラット肝細胞を採取し、温度応答性培養皿にウシ血清アルブミン(FBS)をコーティングすることで、肝細胞の接着を促し平面状の細胞組織を作製した。

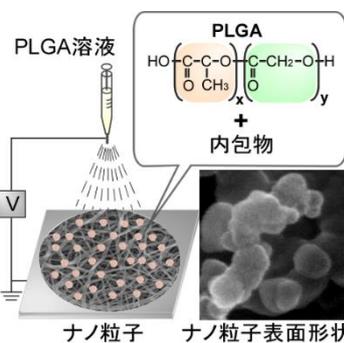


図 1 エレクトロスプレー法によるナノ粒子作製

4. 研究成果

(1) ナノ粒子の形状制御

エレクトロスプレー法によりナノ粒子を作製する際に、印加電圧、エマルションの油相:水相の比率を変化させることで、粒子径、粒子形状の違いを観察した。油相と水相の割合を 500:1 に設定し、印加電圧を増減させたところ、エレクトロスプレー法での印加電圧が増加するに従い、ナノ粒子径が小さくなる様子が観察された(図 2(A)~(C))。印加電圧 12.0 kV では、ナノ粒子が粒子化せずに平膜状になっていることが確認できた(図 2(A))。これは、エレクトロスプレーの際に帯電が不十分であるためと考えられる。

印加電圧 15.0 kV では、ナノ粒子が凝集体を形成した状態であることがわかった(図 2(B))。凝集体の状態になることにより、回収が容易に行えた。一方、印加電圧 20.0 kV では、ナノ粒子がターゲットのアルミホイルに分散し過ぎており、回収が困難であった(図 2(C))。次に油相と水相の割合を 200:1 に変化させてナノ粒子を調製したところ、粒子の輪郭が鮮明ではなく融合された粒子の構造体が観察された(図 2(D))。これは、油相の割合が減ることにより、PLGA の相対量が減るためだと考えられる。以上の結果より、油相と水相の割合を 500:1 にし、印加電圧を 15.0 kV に設定するのがナノ粒子の作製条件として適していることがわかった。

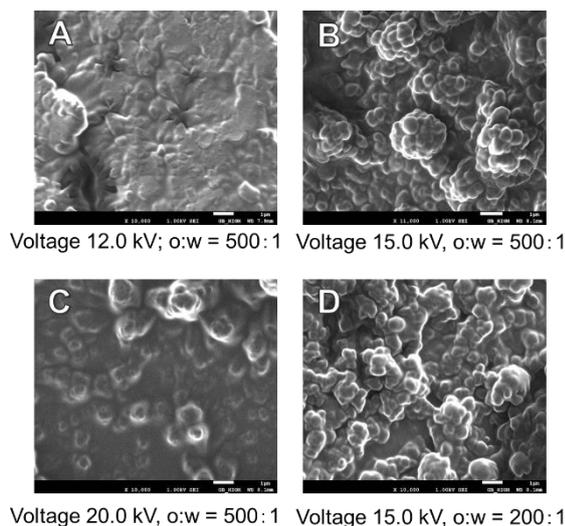


図 2 印加電圧、エマルション比率を変化させたナノ粒子の形状評価

(2) 内包物の溶出挙動

作製したナノ粒子を 37°C で PBS に浸漬させ、内包物の溶出率を観察した(図 3(A),(B))。ナノ粒子 A (作製条件 12 kV, o:w=500:1) では、初期に多くの bFGF が溶出することがわかった(図 3(A))。これは、エレクトロスプレーでの粒子作製時に、粒子表面付近に bFGF が多く存在しているためと考えられる。しかし、5 時間以降はほとんど溶出しなかった(図 3(B))。これは、PLGA が粒子状にならなかったため、比表面積が小さく効果的な分解がおこらなかったためと考えられる。ナノ粒子 B (作製条件 15 kV, o:w=500:1) は 24 時間以内に 80% 程度の内包物が放出し、100 時間まで徐々に内包物を放出する効率的な徐放を示した。これは、ナノ粒子 B は粒子同士が凝集した形状をとっており、PBS に浸漬させると同時に、凝集体が分解して個別のナノ粒子の構造体となり、ナノ粒子が分解するためであると考えられる。ナノ粒子 D (作製条件 15 kV, o:w=200:1) は、24 時間で 60% 程度の内包物の放出を示したが、それ以降の放出率は少なかった。これは、ナノ粒子 D に含まれている bFGF の含有量が少なかったためであると考えられる。

これらの結果より、ナノ粒子 B の構造は効果的な内包物の徐放を示すことがわかった。

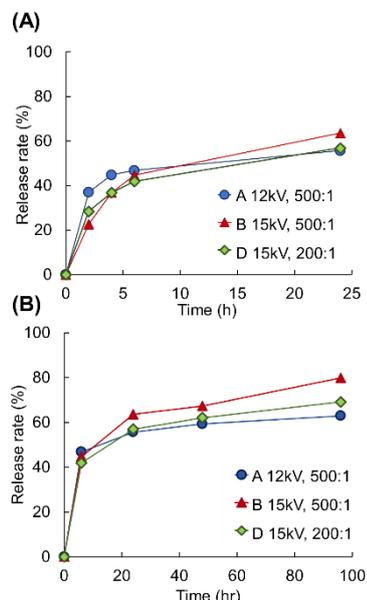


図 3 ナノ粒子からの溶出挙動 (凡例の記号は図 2 に対応)

(3) 細胞組織の作製

移植する細胞組織のモデルとして肝細胞を用いた細胞組織の作製の検討がおこなった(図 4)。ラットから肝細胞を採取し、温度応答性培養皿への播種密度を $0.2 \sim 1.6 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ で変化させて播種した。播種する際に、温度応答性培養皿へウシ血清アルブミン(FBS)をコーティングすることで、肝細胞の温度応答性培養皿への接着を促進させた。コーティングの時間を 24 時間、72 時間で変化させることで、FBS のコーティング量を調節した。

播種密度 $0.2 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の条件では、細胞間隔が大きく細胞組織の作製には至らなかった。一方、 $1.6 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の条件では、細胞間隔が狭くなったが、死滅細胞の割合が多く確認された。これは、細胞密度が増加し過ぎたため、細胞が壊死したと考えられる。 $0.8 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の条件では、連結された細胞組織が形成されていることがわかった。また、培養皿への FBS コーティングの時間を増加させることで、肝細胞の接着が促進することがわかった。

これらの結果より、細胞組織移植を促進させるナノ粒子の作製条件と細胞組織の作製条件を確立することができた。これらの手法を組み合わせることにより細胞組織移植を効率化できる可能性が示唆された。

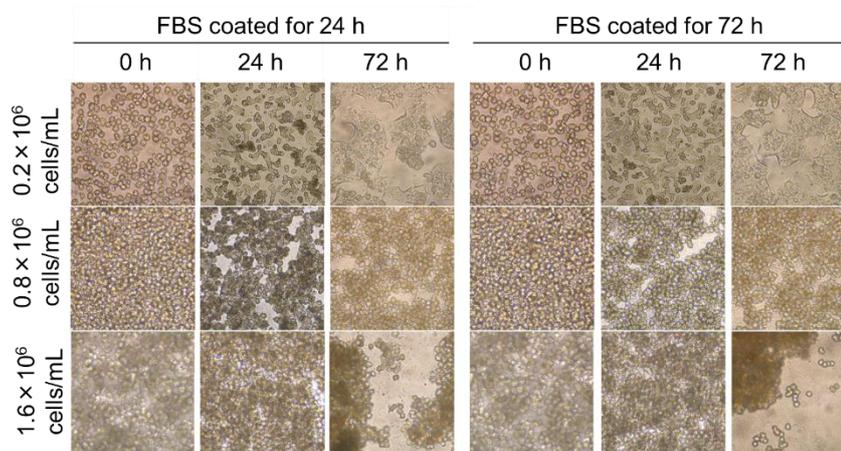


図 4 肝細胞の播種密度、FBS コーティング条件の違いによる肝細胞組織作製の検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagase Kenichi, Kanazawa Hideko	4. 巻 34
2. 論文標題 Design of VEGF Releasing Fiber Mat for Effective Transplantation of Cardiomyocyte Sheets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 173 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2745/dds.34.173	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長瀬 健一, 関根 秀一, 清水 達也, 金澤 秀子, 岡野 光夫, Lee Seung Jin, 大和 雅之	4. 巻 35
2. 論文標題 積層化細胞シートの移植効率向上を目的とした細胞増殖因子徐放ファイバーマットの開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioindustry	6. 最初と最後の頁 36-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長瀬健一, 金澤 秀子
2. 発表標題 機能性高分子が切り拓くDDSと再生医療
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenichi Nagase, Yuhei Nagumo, Miri Kim, Hee-Jung Kim, Hei-Won Kyung, Hye-Jin Chung, Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, Seung-Jin Lee, Masayuki Yamato
2. 発表標題 VEGF Releasing Fiber Mat for Effective Cardiomyocyte Sheets Transplantation
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	金澤 秀子 (Kanazawa Hideko) (10240996)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授 (32612)	
研究 分担者	綾野 絵理 (Ayano Eri) (10424102)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・研究員 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------