

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390510

研究課題名(和文) 血管新生制御技術の複合的応用による新規リビングマテリアルの開発

研究課題名(英文) Development of novel living material by regulation of angiogenesis

研究代表者

小山 博之 (KOYAMA HIROYUKI)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：10241994

研究成果の概要(和文):

組織血流の確保は、組織の生存性や修復能力を高めるための鍵である。本研究では血管新生誘導能をもつ多機能型の新規足場マテリアルとしてスポンジ状材料とゲル状材料を開発し、動物への埋植実験を通じて最適化を実施した。これらを皮膚欠損や骨欠損の動物モデルに適用して、その治療効果を確認した。また、薬剤徐放マテリアルを応用して血管新生因子の効率的デリバリーを目的とした新規ドラッグデリバリー・システムを開発し、動物モデルを用いた修復組織への血管網誘導実験に成功した。

研究成果の概要(英文):

Sufficient blood perfusion is a crucial factor to maintain tissue viability and ability of tissue repair. In the present study, we created sponge-like material and gel material that functioned as intelligent scaffold for neovascular induction, and optimized these materials through in vivo experiments of implantation. These novel materials were applied to animal models of skin defect and bone defect, and appreciable therapeutic effects were obtained. Further, we developed novel drug delivery system of angiogenic growth factor by utilizing a sustained release material. This delivery system of angiogenic growth factor was tested in animal model of muscle ischemia, and neovascular network was successfully developed in the ischemic muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外外科一般、血管新生、マテリアル、スcaffold、
塩基性線維芽細胞増殖因子

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、組織修復に対するニーズが高度・複雑化している

最近の口腔外科領域における組織修復技術の進歩は著しいが、社会構造の高齢化や多様化に伴い、求められる医療ニーズもますます高度・複雑なものとなっている。しかし、通常の外科的技法の発達はほぼ極限に達しつつあり、新しい概念に基づく次世代型治療技術の開発が必要な局面にあるといえる。

(2) 組織血流の確保が次世代型治療実現への鍵

外科的組織修復において、その成否を決定する重要な要因は、修復組織の viability や治癒能力を担保する組織血流であり、この組織血流を確保する方法を確立できれば、次世代型治療開発におけるブレイクスルーになることは疑いない。研究代表者らは、このコンセプトを実現するためには、血管新生を自在に制御するための技術開発が必要と考え、さまざまな知見を蓄えてきた。本研究では、この血管新生制御技術を応用することにより、組織修復医療のための有効性と安全性に優れた新規リビングマテリアル開発を目指した。本研究により創製されたマテリアルを用いれば、従来の組織修復医療よりも格段に高い治療効率を期待でき、治癒に要する期間の短縮や患者の苦痛の軽減、組織再建手術の低侵襲化にも寄与し、結果的に患者の QOL の大幅な改善につながるためその意義は大であると考えた。

2. 研究の目的

(1) 血管新生誘導機能をもつインテリジェント・スカフォールドの開発

血管新生制御技術として血管新生誘導機能をもつスカフォールド・マテリアルの開発を計画した。血管が成長・伸延する足場として必須なのが細胞外マトリックスである。血管新生における細胞外マトリックスの役割としては、(i)血管壁構造を周囲から支持する機能、(ii)血管が成長・伸延していくときにそのスペースを提供する機能、(iii)血管新生に必要な因子を供給する機能がある。開発目標として、これら三つの機能をあわせもつマテリアルを想定した。臨床の様々な局面に対応できるようにするため、スポンジ状とゲル状のマテリアルの開発を予定した。

(2) 血管新生を促進する非ウイルス・ジーンデリバリー・システムの開発

非ウイルスベクターとして注目されている高分子ナノ・ミセル構造体による遺伝子デリバリー法を用いて、血管新生因子の遺伝子を局所へデリバリーすることにより修復組織の血管化促進の可能性を検討する。本研究

では、マテリアルの表面や内部に、高分子ナノ・ミセル構造体をコーティングまたは混合して固定化し、その表面に細胞を接着させることにより高効率に遺伝子導入させる手法である reverse transfection の機転を用いたシステムの開発を予定した。

(3) 血管新生因子の効率的デリバリー・システムの開発

修復組織における血管新生機転を促進するような、血管新生因子のデリバリーシステムを開発する。担体としては、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) タンパクの徐放マテリアルである酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子を用いる。酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子はゼラチンを架橋して安定したハイドロゲルとしたものであり、bFGF と結合させて生体内に投与すると、ゼラチンの吸収に伴い bFGF を徐放する性能を有する。徐放期間は架橋の程度を変えることにより調節可能である。本研究では bFGF の arteriogenesis 機能 (既存の血管の成熟や拡大を促す血管新生の一形態) に注目し、虚血筋組織への機能的血管網誘導技術の開発を目指す。

(4) 皮膚軟部組織治癒促進マテリアルの開発

皮弁・筋皮弁手術や皮膚移植手術後においては、血行障害は再建組織の機能障害や壊死などの原因となる主要な要因である。開発した血管新生誘導マテリアルを応用することにより皮膚・軟部組織領域の治癒促進をはかるリビングマテリアル開発を行う。

(5) 骨形成促進マテリアルの開発

骨欠損の治癒促進のためにも血管の誘導が不可欠なため、上記の血管新生誘導マテリアルを応用することにより骨再生を目的としたリビングマテリアルを開発する。

3. 研究の方法

(1) 血管新生誘導機能をもつインテリジェント・スカフォールドの開発

安全性担保のため臨床で広く用いられているコラーゲンを基盤材料とした。

微小血管のスカフォールド機能も併せ持つ微細スポンジ状マテリアル

すでに実用化されている人工真皮としてのコラーゲン・スポンジの有効性は、in vivo における高い血管新生誘導能により示されている。しかし、その肌理は粗 (ミリメートルのオーダー) なものであり、微細な血管組織 (ミクロメーターのオーダー) の壁構造を直接支持するスカフォールドとはなりえない。したがって、まず線維芽細胞などの肉芽組織がスポンジ構造内に入り込み、その肉芽組織内の細胞外マトリックスに支持された形で新生血管は発達してい

るはずである。本研究では、さらに高効率の血管新生誘導を実現するため、スポンジ空隙に新生血管のスcaffoldとしての微細マトリックス構造を導入することを計画した。微細マトリックスは、エレクトロスピニング法によるナノ・オーダーのファイバー構造で作成する予定とした。

血管新生因子の徐放機能を付与したゲル状マテリアル

コラーゲン分子には、多彩な細胞接着部位が存在し、また MMP、PA などのプロテアーゼにより分解・消化を受ける。一方、コラーゲン・ゲルはコラーゲンファイバーがマトリックス状になった構造体に水分が含まれたものである。そのため、コラーゲン・ゲルは、血管の足場としての細胞外マトリックスの機能を果たす可能性を有する。本研究では、まずコラーゲン分子に修飾を施すことにより bFGF の結合能を付与する。その後、さまざまな条件でゲルを作成し、主に in vivo での血管新生誘導能評価を通じて最適化を実施する。In vivo 評価は、ラット腹直筋の筋膜下へのインプラントの後、標本を回収し、組織標本の形態的観察や測定により行う。

(2) 血管新生を促進する非ウイルス・ジーンデリバリー・システムの開発

高分子ナノ・ミセル構造体は、安全性の高い遺伝子ベクターとして期待されているが、遺伝子導入効率は未だ満足できるレベルには達していない。そのため本研究では、最近注目されている reverse transfection 技法を用いた遺伝子導入法について検討する予定である。通常の遺伝子ベクターは固定したターゲットに対してアプライするものであるが、reverse transfection はその反対で、固定化したベクターに対してターゲットをアプライするというものである。高分子ナノ・ミセル構造体にマーカー遺伝子を包含し、コラーゲン・ゲル内にミセルを混和し培養皿に流しこんで固めたものに、血管内皮細胞や平滑筋細胞を播種して経時的に遺伝子発現を測定する。適切な条件設定ができれば、bFGF などの血管新生因子遺伝子を包含させたミセルをコラーゲン・ゲル内に固定化して動物に埋植することにより血管新生誘導能を評価する予定とした。

(3) 血管新生因子の効率的デリバリー・システムの開発

血管新生誘導による組織修復のモデルとして、筋組織に bFGF を適切にデリバリーす

ることにより、組織に残された minor な栄養血管網を major な栄養血管網に成長・成熟させるシステムの開発をめざした。具体的には、ラビット下肢の薄筋は、dominant pedicle と minor pedicle の 2 系統の栄養血管により養われており、このうち dominant pedicle を切断すると広範な筋壊死が惹起されることが知られている。この薄筋に対して、酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子による bFGF 徐放システムを応用し、minor pedicle の成長を誘導して dominant pedicle を切断しても筋壊死を回避することが可能となるかを検証する。

(4) 皮膚軟部組織治癒促進マテリアルの開発

本研究で開発した血管新生誘導 scaffold の治療効果をマウス皮膚欠損モデルで検討する。創傷治癒が不良である db/db マウスの背部に作成した皮膚欠損にマテリアルを貼付し、経時的に皮膚欠損の治癒と血管誘導に関して解析する。

(5) 骨形成促進マテリアルの開発

本研究で開発した血管新生誘導 scaffold による骨再生促進効果を、ラット骨欠損モデルで検討する。ラットモデルとしては、頭蓋骨に直径 8mm の骨欠損を作成した。骨欠損部に血管新生誘導 scaffold を配置して、マイクロ CT を用いて経時的に観察するとともに、組織学的、生化学的な検討を加える。

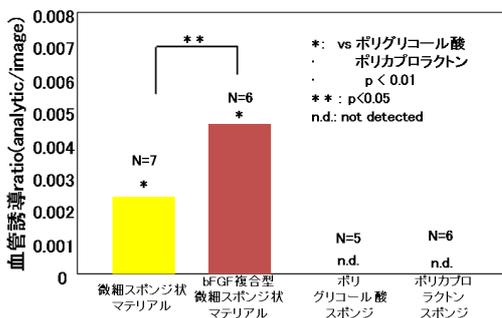
4. 研究成果

(1) 血管新生誘導機能をもつインテリジェント・ Scaffold の開発

微小血管の Scaffold 機能も併せ持つ微細スポンジ状マテリアル

エレクトロスピニング法によるナノ・オーダーのファイバー構造によって微細マトリックスを作成する方針とした。基本材料はすでに臨床において広く使用されているコラーゲンとし、これに肉芽誘導作用をもつ吸収性材料であるポリグリコール酸を加えた。またエレクトロスピニング法では、ノズルより噴射したナノ・ファイバーを平面に吸着させて作成するため、二次元的 (x-y 方向) には適度の間隙のあるマトリックスを構築することが可能であるが、立体的にみると嵩方向 (z 方向) には押しつぶされるという問題点があった。そのため、エレクトロスピニングを溶媒中にむけて実

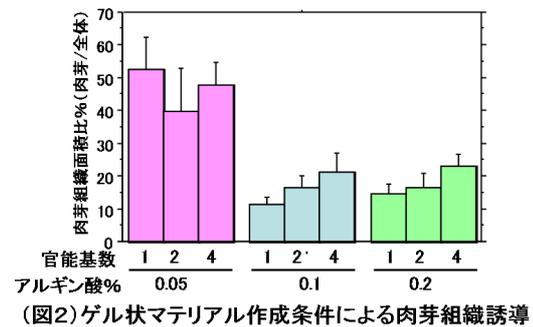
施するような工夫を加えることにより、z 方向においても適度な間隙のある微細スポンジ構造を構築することに成功した（微細スポンジ状材料）。またこの微細スポンジ状材料をフィブロネクチンとヘパリンで処理することにより bFGF を結合させた bFGF 複合型微細スポンジ状材料も作成した。作成したプロトタイプは、逐次ラット筋膜下にインプラントした。対照としてはポリグリコール酸のみで作成した微細スポンジと、同じ吸収性材料であるポリカプロラクトンにより作成した微細スポンジをインプラントした群を作成した。回収は 5 日目で、微細スポンジ状材料及び bFGF 複合型微細スポンジ状材料において内部への血管組織を含んだ肉芽組織の進入が認められた（図 1）。血管であることは vW 因子染色によっても確認された。これに対し、ポリグリコール酸による微細スポンジとポリカプロラクトンによる微細スポンジでは内部への肉芽組織の進入や血管進入ともに認められなかった（図 1）。以上の結果より、作成した微細スポンジ状材料は、血管新生誘導機能をもつスカフォールド材料としての機能を持つことが示された。



(図1) 微細スポンジ状材料の血管誘導効果

血管新生因子の徐放機能を付与したゲル状材料

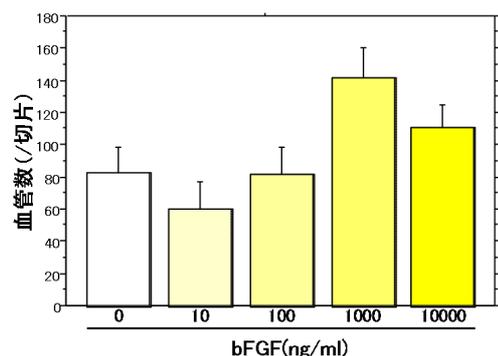
コラーゲンを基本材料とした様々なゲル状材料を作成し、ラット筋膜下へのインプラント実験を通じて最適化をはかった。そのひとつに、コラーゲンにアルギン酸を共有結合させてカルシウムイオンによりイオンコンプレックスを形成しゲル化させた材料（ゲル状材料）がある。アルギン酸の濃度や、コラーゲンとの共有結合のためにアルギン酸に付加した官能基数を様々な条件に振ってプロトタイプを作成した。ラット筋膜下へのインプラント後、5 日目に回収し、標本の組織切片を作成し、HE 染色と vW 因子染色により評価を実施した。インプラントしたゲル内部に



(図2) ゲル状材料作成条件による肉芽組織誘導

は、プロトタイプにより様々な程度で血管豊富な肉芽組織が周囲の宿主組織から発達している所見を得ることができた。これらを数値化することにより、ゲル状材料を構成するアルギン酸の濃度が 0.05% の時に、血管誘導用スカフォールドとして最も優れた効果をしめすことが明らかになった。そして、アルギン酸に付加した官能基数は血管誘導の程度に大きな影響を及ぼさないことも明らかになった（図 2）。

また、このゲル状材料を構成するアルギン酸は bFGF タンパクと相互作用しリザーブする機能をもつため、上記の検証で優れた効果の確認できたゲル状材料に対して様々な濃度で bFGF をリザーブさせたインテリジェント・材料を作成し、同様の実験を実施した。結果としては、1000ng/ml の濃度で bFGF をリザーブさせた場合が、最も血管誘導効果を高めることが明らかになった（図 3）。



(図3) bFGFを複合化したゲル状材料の血管誘導

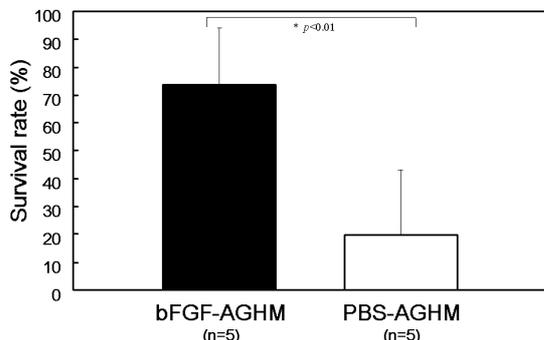
(2) 血管新生を促進する非ウイルス・遺伝デリバリー・システムの開発

本研究で用いた高分子ナノ・ミセル構造体は、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ発現プラスミドベクターを中核とし、水溶性ポリエチレングリコール (PEG) とカチオン連鎖

であるポリ-L-リジン (PLL) が連結したブロック共重合体により周囲を被覆されたポリイオンコンプレックス(PIC)を基本構造としたものである。コラーゲン・ゲル内にミセルを混和し培養皿に流しこんで固めたものに、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) を播種することにより reverse transfection の条件を整え、経時的に遺伝子発現を測定した。しかし、結果は HUVEC に対して直接にミセル溶液をかけた場合と比較して有意な遺伝子発現の改善は認められなかった。またミセルを固相化させるために用いたコラーゲンの濃度を様々に調節するなど reverse transfection のコンディションを変えてみたが結果は同様であった。そのため、本ゼンデリバリー開発に関しては断念することとした。

(3) 血管新生因子の効率的デリバリー・システムの開発

ラビット下肢の薄筋には、dominant pedicle と minor pedicle の 2 系統の栄養血管により養われており、この場合 dominant pedicle を切断すると広範な筋壊死が惹起させる。この薄筋の dominant pedicle の支配領域と minor pedicle の支配領域の中間帯に対して bFGF (50 μ g) を結合させた酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子を注射した群と、対照として PBS で処理した同量の酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子を注射した群の 2 群を作成した。その 7 日後に、dominant pedicle を切離して minor pedicle のみを血管茎とした薄筋フラップをおこし、周囲からの血管の侵入を防ぐためにフラップをシリコンシートで被覆して閉創した。さらに 7 日後に、薄筋の viability やマイクロ血管造影スコア、局所血流量の測定を実施しところ、すべてのパラメータにおいて bFGF のデリバリーを実施した群で有意な改善を認めた (図 4)。特に



(図4) bFGFの効率的デリバリーによる筋組織のviability変化

viability においては、対照群においては生存部位が 20%程度であったのが bFGF デリバリー群では 70%と、抜群の壊死回避効果が示された。なおプレリミナリーで bFGF タンパクを直接注射するのみの実験を実施したが、治

療効果は認められず、酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子の使用により bFGF の効果的なデリバリーがなされたことが示唆された。

(4) 皮膚軟部組織治癒促進マテリアルの開発

微細スポンジ状マテリアルが優れた血管新生誘導効果をもつことが示唆されたため、皮膚軟部組織治癒促進を目的とした応用研究を実施した。db/db マウスの背部に皮膚欠損を 2 箇所作成し、片方には微細スポンジ状マテリアルを、他方には人工真皮として発売されているコラーゲンスポンジ (粗い肌理) を貼付し、さらにチェンバーで覆うことにより、血管誘導の過程をリアルタイムで観察した。貼付後、5、7、10 日目に観察したが、そのすべてにおいて微細スポンジ状マテリアル内への血管誘導がコラーゲンスポンジのそれを凌駕し、7 日目においては有意差が得られた。創の治癒に関しても組織学的に検討したが、微細スポンジ状マテリアルを貼付した創における治癒機転が優位であった。この結果は、皮膚軟部組織の組織修復において血管新生誘導マテリアルの応用が有用であることを示唆しているものと考えられる。

(5) 骨形成促進マテリアルの開発

微細スポンジ状マテリアルをラット頭蓋に作成した骨欠損部に貼付し、貼付しない場合と比較した。マイクロCTを経時的に撮影し、骨欠損部への骨再生を観察した。手術後 4 週間において、微細スポンジ状マテリアルを貼付したラットでは骨欠損部の 50%以上を占める明らかな骨再生が観察できたのに対し、貼付していないラットでは、骨再生がほとんど認められなかった。この実験に関しては、ひきつづき骨再生の定量化や組織学的な検討を実施しているが、本報告時点において未だ系統だった結果を得るに至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件) すべて査読あり

Oba M, Koyama H, Kataoka K, et al. Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble flt-1. Mol Pharm. 2010; 7(2):501-509.

Takayama T, Taguchi T, Koyama H, et al. The growth of a vascular network inside a collagen-citric acid derivative hydrogel in rats. Biomaterials. 2009, 30(21):3580-3587.

Hashimoto T, Koyama H, Miyata T, et al. Selective and sustained delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) for treatment of peripheral arterial

disease: results of a phase I trial. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2009 ;38:71-75.

Katsu M, Koyama H, Maekawa H, et al. Ex vivo gene delivery of ephrin B2 induces development of functional collateral vessels in a rabbit model of hind limb ischemia. J Vasc Surg. 2009;49:192-198.

Matsumoto S, Oba M, Koyama H, et al. Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery. Biomacromolecules. 2009 ;10:119-127.

Yasuda Y, Koyama H, Oba M, et al. Controlled delivery of bFGF remodeled vascular network in muscle flap and increased perfusion capacity via minor pedicle. Journal of Surgical Research. 147(1):132-7, 2008

Fujihara Y, Koyama H, Oba M, et al. Controlled delivery of bFGF to recipient bed enhances the vascularization and viability of an ischemic skin flap. Wound Repair & Regeneration. 16(1):125-31, 2008

Miyata K, Oba M, Koyama H, et al. Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. Journal of the American Chemical Society. 130(48):16287-94, 2008

Oba M, Koyama H, Kataoka K, et al. Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide cross-links directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking. Molecular Pharmaceutics. 5(6):1080-92, 2008

Miyata K, Oba M, Koyama H, et al. Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor tissue. Pharmaceutical Research. 25(12):2924-36, 2008

Takae S, Oba M, Koyama H, et al. PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral

gene vectors. Journal of the American Chemical Society. 130(18):6001-9, 2008

Akagi D, Koyama H, Miyata T et al, Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation, Gene Therapy, 14, 2007, 1029-1038

Oba M, Koyama H, et al, Cyclic RGD peptide-conjugated polyplex micelles as a targetable gene delivery system directed to cells possessing avb3 and avb5 integrins, Bioconjugate Chemistry, 18, 2007, 1415-1423

[学会発表](計 3件)

服部理恵子、小山博之ら、立体的な組織の再生を目指した血管誘導ゲルの開発、日本再生医療学会、第9回総会、口演、2010年3月18日(広島)

小山博之、The Technological State and Prospect for Three-dimensional Complex Organ Structures、BioJapan2008、2008年10月16日(横浜)

橋本拓也、小山博之ら、bFGF蛋白の経動脈的ピンポイントデリバリー法による血管再生療法、日本血管外科学会、第36回総会シンポジウム、2008年4月18日(東京)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 博之 (KOYAMA HIROYUKI)
東京大学医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 10241994

(2) 研究分担者

近津 大地 (CHIKAZU DAICHI)
東京大学医学部附属病院・講師
研究者番号: 30343122
森 良之 (MORI YOSHIYUKI)
東京大学医学部附属病院・准教授
研究者番号: 70251296
大庭 誠 (OBA MAKOTO)
東京大学医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 20396716
米原 啓之 (YONEHARA HIROYUKI)
東京大学医学部附属病院・准教授
研究者番号: 00251299