

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21689037

研究課題名（和文）細胞移植を模倣した新規心筋再生因子キャリアによる心筋再生治療の確立

研究課題名（英文） Development of the new carrier device for sever heart failure using apoptotic cell-mimetic liposome

研究代表者

齋藤 充弘（SAITO ATSUHIRO）

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20448038

研究成果の概要（和文）：

近年、重症心不全や下肢虚血に対する新たな治療法として、造血幹細胞や骨髄幹細胞を注入し機能改善を図る再生医療が注目されている。一方で、アポトーシスを起こした移植細胞が、移植された周辺の組織へ炎症反応を制御することが報告されている。本研究では、アポトーシスに陥った細胞を模倣した細胞サイズのリポソームによって、組織の炎症を制御しながら組織の修復・再生を実現するような、新規の再生治療用材料を開発した。

研究成果の概要（英文）：

We developed the new carrier device for sever heart failure using apoptotic cell-mimetic liposome. It induced anti-inflammatory effect in ischemic tissue and improved cardiac function after myocardial infarction. It may be a novel candidate of the carrier for tissue engineering.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
平成 22 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
平成 23 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
総計	20,900,000	6,270,000	27,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心筋再生、DDS

1. 研究開始当初の背景

近年、虚血性心疾患等に伴う重症心不全に対する新たな治療法として、様々な細胞の注入療法による再生医療が注目されています。その例として、造血幹細胞や骨髄幹細胞を心臓の虚血部位へ移植すると、心機能を改善することが報告されている（von Harsdorf R, et al. Lancet 363:1306-13, 2004）。しかし、現

時点での細胞移植においては自己細胞しか利用できないこと、そして細胞を採取してから移植するまでに培養工程が必要で、それに関連する多大な費用がかかること等の問題がある。そして何より、実際に心臓に細胞を移植しても、移植細胞の心筋組織への生着率はほんの数%にすぎないと言われている。インジェクションの時点で 5～25%の細胞は既

にアポトーシスやネクローシスを起こし (Wollert KC, et al. Lancet 364:141-8, 2004)、移植後も虚血環境下においてアポトーシス因子や細胞毒性因子にさらされることで、大部分の細胞がアポトーシスを起こすと言われている (Geng YJ. Ann N Y Acad Sci 1010:687-97, 2003)。これまで我々は、自己筋芽細胞を細胞シート工学により組織化し、これを重症心不全モデルに移植することにより著明な組織、機能改善が起こることを示した。細胞シートを用いた移植方法ではインジェクションよりも移植効率は改善するが、一箇所にも3-4枚以上の細胞シートを移植すると、同様にアポトーシスを起こす。一方で、そのアポトーシスを起こした細胞が、細胞表面に露出するフォスファチジルセリンを介して移植部周辺の細胞(心筋細胞や免疫細胞)へ免疫反応を制御するようなシグナルを出すという報告がなされている (Thum T, et al. J Am Coll Cardiol 46(10): 1799-802, 2005)。正常細胞では細胞膜の内側に局在するフォスファチジルセリンが、アポトーシスを起こすと細胞外へと局在を変え、マクロファージはフォスファチジルセリンレセプターを介してアポトーシス細胞を認識し、貪食する。フォスファチジルセリンレセプターからの刺激を受けたマクロファージは、IL-10などの抗炎症性サイトカインを分泌することで、アポトーシス細胞が炎症を伴うことなく処理される。

急性心筋梗塞など心筋組織が虚血状態に陥ると、その壊死性の心筋組織で炎症反応が起こるとするのは周知の事実であり、虚血環境に加え、その炎症性サイトカインにより引き起こされる心筋細胞のアポトーシスやネクローシスが、心不全に至る原因と言われている。つまり、梗塞部位において炎症反応を抑制することは、心筋組織のアポトーシス抑制、そして心機能増悪を抑制できるのである。

これまで我々は、自己筋芽細胞を細胞シート工学により組織化し、これを重症心不全モデルに移植することにより著明な組織、機能改善が起こることを示した。しかし、この方法では、細胞グラフトを作成するために自己細胞を長期間培養する必要があり、緊急性の高い治療を要する重症患者への対処が困難である。さらに、治療効果や品質の安定性の確保が困難な生物由来製品に対するわが国の厚生労働省の審査のハードルの高さは、トランスレーショナルリサーチの進展を阻んでおり、細胞培養が不要な規格化・製品化された再生治療用キャリアの開発が急務である。

もし本研究が完結し臨床応用されれば、既存の細胞移植法に要する時間と費用を大幅に削減することが可能となり、さらに緊急性の高い症例に対しても適用が可能で、汎用性

の高い治療法になりうると考えられる。また、細胞を用いずに炎症を抑え、且つ自己修復能を賦活化することで組織を再生するという strategy は、体内すべての組織の再生に共通の基本技術として応用が可能で、その波及効果は計り知れない。

2. 研究の目的

本研究では、フォスファチジルセリン含有した細胞サイズのリポソームによって、アポトーシスに陥った細胞を模倣することで、組織の炎症反応を制御する。人工合成が可能なりポソームであれば、安価且つ容易に、そして拒絶反応の影響なく炎症を抑えことができる。さらに、リポソーム内に心筋組織修復・再生を促すようなタンパク質や遺伝子等を内包することで、炎症を制御しながら組織の修復・再生を実現するような、新規の心筋再生治療用キャリアを開発し、細胞を用いない心筋再生医療を実現することを目的とする。

3. 研究の方法

① フォスファチジルセリンを含有し細胞サイズのリポソームの作製

様々な割合の脂質で効率よく細胞サイズのリポソームを作製できる条件を検討した。

② in vitro 評価

肺胞マクロファージを採取し、Lipopolysaccharide (LPS)で刺激した後、作製したリポソームを培養液中に滴加する。24時間後、培養液中の炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-1 β)及び抗炎症性サイトカイン (IL-10, TGF- β) レベルをELISAにより測定した。

また、心筋細胞においても同様の評価を行いフォスファチジルセリン含有リポソームの抗炎症作用について検討する。さ

③ in vivo 評価

左前下行枝結紮による心筋梗塞モデルラットを作製し、フォスファチジルセリン含有リポソームを心筋内に直接注入し心機能増悪の抑制効果について評価する。具体的には、移植後4週、8週後の組織評価、及び心臓超音波検査にて、機能評価を行う。

4. 研究成果

① フォスファチジルセリンを含有し細胞サイズのリポソームの作製

PS-リポソームの形成は位相差顕微鏡にて確認され、そのリポソームサイズの直径はおよそ5~50 μm であり、細胞のサイズと近い

ことがわかった(図 1)。リポソームの大きさの違いが細胞に影響を与えるかを調べるため、このセルサイズ PS-リポソームと、0.45 μm のフィルターを通した PS-リポソーム(直径 0.45 μm 以下の PS-リポソーム)をそれぞれ LPS 刺激したマクロファージに加えた。すると、セルサイズ PS-リポソームを添加した群の方が顕著にマクロファージからの炎症性サイトカイン (TNF- α and IL-1 β) の分泌を抑制していた (図 1)。これらの結果より、リポソームのサイズの違いにより、細胞への影響に差異があることが示唆された。

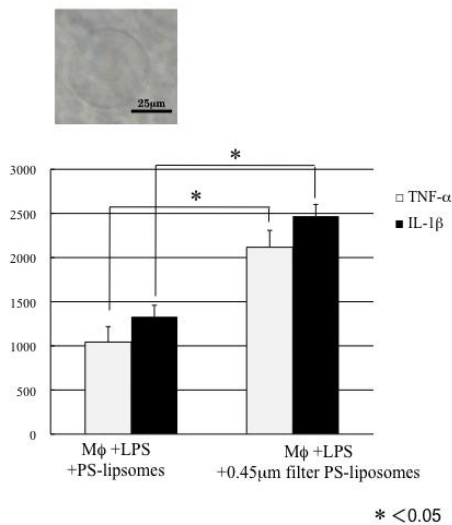


図 1 フォスファチジルセリンを含有し細胞サイズのリポソームの作製

② in vitro 評価

セルサイズリポソームがマクロファージからの炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β and IL-6) 及び抗炎症性サイトカイン (TGF- β and IL-10) の分泌にどの程度寄与しているかを詳細に調べるため、以下の群で比較検討を行った。1. マクロファージ, 2. LPS 刺激されたマクロファージ, 3. LPS 刺激されたマクロファージ+正常細胞, 4. LPS 刺激されたマクロファージ+H2O2 により誘導されたアポトーシス細胞, 5. LPS 刺激されたマクロファージ+セルサイズ PS-リポソーム, 6. LPS 刺激されたマクロファージ+脂質(リポソーム作製時と同濃度)。まず、炎症性サイトカインにおいて(図 2)、LPS 刺激したマクロファージ群に対し、正常細胞を加えた群では TNF- α 及び IL-1 β で 10-15%程度優位に抑制され

ていたが、IL-6 に関して差異は得られなかった。次にアポトーシス細胞を加えた群では、TNF- α , IL-1 β 及び IL-6 全てにおいて有意な抑制が確認され、TNF- α においてはおよそ 50%程度抑制されていることがわかった。さらに、セルサイズ PS-リポソームを加えた群においては、TNF- α , IL-1 β 及び IL-6 全てにおいて顕著な抑制が確認され、全ての因子において 80%以上の抑制が認められた。一方、リポソームを作製する際と同濃度の脂質を加えた群においては、リポソーム時のような抑制効果は認められなかった。

対照的に、抗炎症性サイトカインにおいては(図 3)、LPS 刺激したマクロファージ群に対し、正常細胞を加えた群では TGF- β and IL-10 で有意な差異は見られず、アポトーシス細胞を加えた群では、TGF- β は約 2 倍、IL-10 は約 1.5 倍量の増加が見られた。次に、セルサイズ PS-リポソームを加えた群においては、TGF- β 及び IL-10 共におよそ 5 倍量の増加が確認され、同濃度の脂質を加えた群ではこのような増加は認められなかった。

これらの結果より、フォスファチジルセリンを含む脂質がリポソームを形成することで、リポソーム自体が抗炎症効果の機能を有するキャリアであることが示唆された。

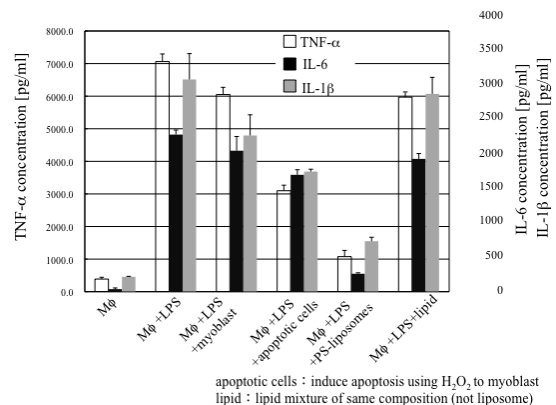


図 2 セルサイズリポソームによるマクロファージからの炎症性サイトカイン分泌

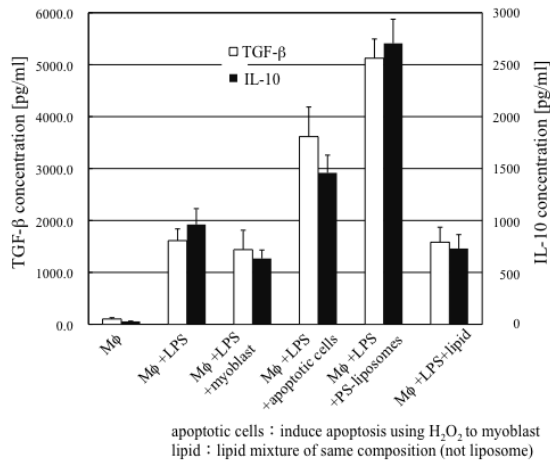


図3 セルサイズリポソームによるマクロファージからの抗炎症性サイトカイン分泌

③ in vivo 評価

in vivo においてもセルサイズ PS-リポソームがこの抗炎症効果を有するかを検討した。まずラット心臓を left anterior descending (LAD) coronary ligation により心筋梗塞を誘導し、ligation 後、急性期にセルサイズ PS-リポソームもしくは saline (control 群) を梗塞領域に注入した。注入後 1 日目と 3 日目の心臓を採取し、組織染色を行ったところ、control 群では TNF- α 及び IL-6 において顕著に発現が認められたのに対し、セルサイズ PS-リポソーム注入群では TNF- α 、L-6 の発現の減少、及び TGF- β の発現が認められた。これらの組織画像を Metamorph を用いて画像解析を行ったところ、注入後 1 日目において、PS-リポソーム移植群のほうが TNF- α 及び IL-6 で約 70% の減少、TGF- β に関してはおよそ 2.5 倍量の発現が確認された(図 4)。また、注入後 3 日目においてもこれらの効果は持続しており、TNF- α 及び IL-6 で約 50% の減少、TGF- β に関してはおよそ 2.1 倍量の発現が認められた(図 5)。これらの結果より、セルサイズ PS-リポソームを移植することで、ligation により引き起こされる初期の炎症を抑制することが示された。すなわち、セルサイズ PS-リポソームは in vivo においても抗炎症効果を有することが示唆された。

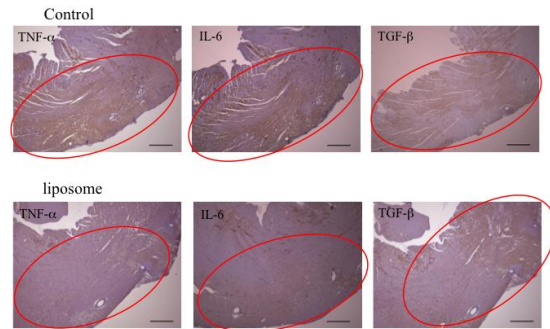


図4 心筋梗塞モデルラット移植後 1 日の組織免疫染色像

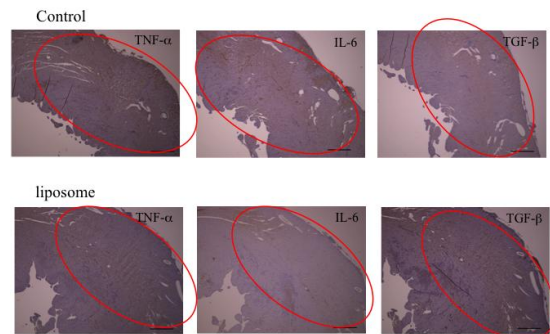


図5 心筋梗塞モデルラット移植後 3 日の組織免疫染色像

セルサイズ PS-リポソームの抗炎症効果が ligation による心機能の低下を抑制するかを検討するため、セルサイズ PS-リポソームもしくは saline (control 群) 注入後 1 週目～4 週目まで心機能を echocardiograph により測定した(図 6)。その結果、コントロール群では、ligation 後 1 週目で EF が 41.5% まで低下したのに対し、セルサイズ PS-リポソーム注入群では 1 週目での EF が 48.6% とコントロール群に比べ有意に心機能の低下を抑制していた。また ligation 後 4 週目においても、コントロール群の EF が 34.6% なのに対し、セルサイズ PS-リポソーム注入群の EF が 41.4% と、有意に心機能の低下が抑制されていた。また、その他の心機能評価項目 (LVd, LVDs, LVEDA, LVESA) においても PS-リポソーム移植群のほうがコントロール群に比して有意に増悪を抑制していることが認められた。また、注入後 4 週目での心臓を採取し、HE 染色を行ったところ、セルサイズ PS-リポソーム注入群のほうがコントロール群に比して、左室壁が厚く、fibrosis area も減少していることが認められた(図 6)。これらの結果より、セルサイズ PS-リポソーム注入による初期の抗炎症効果が心機能低下の抑制に寄与していることが示唆された。

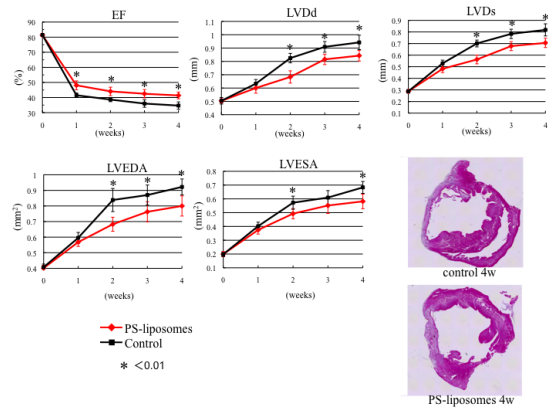


図 6 心筋梗塞モデルラット移植後の心臓超音波検査と組織像

心不全治療法の一つとして様々な細胞を用いた細胞移植療法が開発されており、動物モデルにおいて、既に筋芽細胞や骨髄細胞の injection により心機能改善効果を認めたという報告もある。しかし、injection による移植細胞は、移植の時点で既に一部の細胞が死んでおり、移植後 1~2 週間以内に 90%以上の移植細胞が血流により心臓外へ流出するか、心筋の虚血環境によりアポトーシスやネクローシスを起こし死んでしまう。だが、近年この心筋内でアポトーシスを起こした移植細胞が、アポトーシスを起こすと細胞膜表面へ露出する phosphatidylserine を介して、心筋内での免疫反応を抑制するという報告がなされた。

今回の研究において、我々はこのようなアポトーシス細胞をリポソームで模倣し、そのセルサイズ PS-リポソームが in vitro と in vivo の両方で抗炎症効果を示すかどうかを検討した。その結果、まず、PS-リポソームのサイズの違いにより、LPS 刺激したマクロファージからの炎症性サイトカインの分泌抑制に差異があった。これらの差異が起こる理由として考えられるのは、PS-リポソームとマクロファージの接触後、PS-リポソームのサイズが小さければ直ぐに膜融合もしくは貪食作用によりマクロファージに吸収され、phosphatidylserine とマクロファージ上の phosphatidylserine receptor (PS-R) との結合が短期間になるからではないかと考えられる。しかし、PS-リポソームのサイズが細胞サイズのように大きければ、接触したマクロファージとの膜融合や貪食作用が起こりにくくなるため、その結果 PS と PS-R との結合が長時間になることで PS-リポソームの抗炎症効果も持続し、炎症性サイトカインの分泌抑制につながったのではないと思われる。

次に、セルサイズ PS-リポソームの in vitro での抗炎症効果を炎症性サイトカイン

である TNF- α 、IL-1 β and IL-6 及び抗炎症性サイトカインである TGF- β and IL-10 の項目で検討した結果、いずれのファクターにおいてもアポトーシス細胞を加えた時以上に LPS-刺激したマクロファージに対する抗炎症効果が認められた。また、リポソームを形成していない同濃度の脂質を加えても、抗炎症効果はほとんど認められなかった。この結果により、phosphatidylserine はリポソームを形成することで初めてその効果を発揮することが示唆され、その効果はアポトーシス細胞を加えた群よりも大きいことが認められた。しかしこの実験系で一つ留意しなければならないことは、加えたアポトーシス細胞の Annexin V 陽性率はおよそ 70 %であり添加時点で全ての細胞がアポトーシスを起こしている状態ではないという点である。そのため、アポトーシス細胞を加えた群はセルサイズ PS-リポソームを加えた群よりもその効果が低かったのかもしれない。いずれにせよ、セルサイズ PS-リポソームが炎症性サイトカインの分泌を抑制し、抗炎症性サイトカインの分泌を有意に促進することが示された。

in vivo での検討において、セルサイズ PS-リポソームを注入することで、ligation による初期の炎症反応を抑制することが示された。すなわち、セルサイズ PS-リポソームが梗塞領域でマクロファージや樹上細胞などの炎症細胞と反応し、炎症反応を制御したことが示唆される。また、この初期の炎症反応の抑制が、その後の心機能の増悪を抑制することも確認された。この in vivo での炎症反応及び心機能増悪の抑制のメカニズムについては更なる検討が必要である。

セルサイズ PS-リポソームが in vitro 及び in vivo の両方で抗炎症効果を示すキャリアであることが今回の実験で示された。だが、セルサイズ PS-リポソームには更なる可能性がある。リポソームであるため様々な化合物や遺伝子、タンパク質を内包でき、それらを組み合わせることで更なる治療効果を生み出せると考えられる。すなわち、まずセルサイズ PS-リポソームで長期的に患部の炎症を抑え、そしてリポソームが融合ないし貪食されることで内包された化合物や遺伝子、タンパク質が放出し、次の効果を生み出すという戦略である。この治療法は心不全治療のみならず、その他様々な疾患へも応用可能であるだろう。またセルサイズ PS-リポソームがセルフリーであることが汎用性を高める最大の利点である。細胞治療の場合は患者から細胞を採取し、培養して増殖させるのに数週間~数ヶ月は必要であるが、セルサイズ PS-リポソームは事前に作製できるため緊急の場合にでも対応できる。

このようにセルサイズ PS-リポソームには様々な可能性を有しており、これからのセル

フリー治療法の一つとなるかもしれない。

大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70544237

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計3件)

- ① 齋藤 充弘、細胞シートによる心筋再生治療の現状と展望、細胞シート2009公開シンポジウム、2009年9月10日、東京
- ② 齋藤 充弘、炎症反応を応用した機能性バイオマテリアルの開発、日本再生医療学会、2011年3月2日、東京
- ③ 鎌田創吉、坂口太一、宮川 繁、吉川泰司、山内 孝、斉藤俊輔、首藤泰広、三木健嗣、齋藤充弘、上野高義、倉谷 徹、澤 芳樹、ラット急性心筋炎モデルでのアポトーシス細胞模倣リポソームの治療効果の検討、日本再生医療学会、2011年3月1日、東京

[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
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 充弘 (SAITO ATSUHIRO)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20448038

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

澤 芳樹 (SAWA YOSHIKI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00243220

宮川 繁 (MIYAGAWA SHIGERU)