

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300181

研究課題名(和文)天然高分子複合体微粒子による機能性たんぱく質及び幹細胞デリバリーシステム

研究課題名(英文)Protein and stem cell-delivery systems using nanoparticles of natural polymer composites

研究代表者

石原 雅之 (Ishihara, Masayuki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・防衛医学研究センター)教授

研究者番号：10508500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 2,460,000円

研究成果の概要(和文)：医療用注射薬である低分子化ヘパリン(フラグミン)とその中和剤であるプロタミンを混合して得られるF/P M/NPsは、FGFやHGF等の増殖因子或いはPRP(多血小板血漿)由来の機能性たんぱく質キャリアとしての適用について検討した。さらに、F/P M/NPsと間葉系幹細胞(BMSCsやASCs)凝集体導入法を用いた血管新生促進剤、難治性創傷治癒促進剤の有効性・安全性を、主としてマウス、ラット、兔を用いたin vivoの研究を中心に検証した。特に、機能性タンパク質含有F/P M/NPsを用いたヒト育毛治療を実施し、その有効性・安全性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Fragmin/protamine micro/nanoparticles (F/P M/NPs) were evaluated as a carrier for growth factors such as FGF and HGF and PRP (platelet-rich plasma) derived functional proteins. In addition, F/P M/NPs in combination with adipose-derived stromal cells (ASCs), are a new convenient cell carrier and may be a promising novel therapy for inducing vascularization and healing healing-impaired wounds in ischemic disease by transplantation of the ASCs/F/P M/NPs aggregates. Thus, LMW-H/P M/NPs are an excellent carrier for GFs and various cells such as ASCs. Clinical research was performed using autologous PRP/F/P M/NPs. Hair growth and thickening following the administration was observed in all patients compared with the control and its efficiency and safety were demonstrated.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体材料 生物・生体工学 ナノ材料 移植・再生医療 再生医学

1. 研究開始当初の背景

生体内投与後の機能性たんぱく質等バイオ医薬品の局所への徐放化とともに安定性や活性を向上させながら、特定の細胞や組織に効率よく作用して治癒効果を高めるためのデリバリーシステムが求められている。我々は低分子化ヘパリン（フラグミン）/プロタミン マイクロ/ナノ粒子（F/P M/NPs）を用いた機能性たんぱく質のデリバリーシステムの開発とともに、それらを担持した、或いは生産能力を有する細胞そのものを局所に送達する新しい治療法の研究・開発を実施する。一般に生細胞自体は不安定で、そのままでは医薬品としての利用は難しい。そこでこれらの細胞を F/P M/NPs との凝集体（スフェロイド）にすることで、生体内で安定化させ、局所への接着性や生着率を高めることが可能な、新しい細胞デリバリーシステムを創製し、その実用化を目指す。

2. 研究目的

(1) フラグミンとプロタミンからなる多電荷天然高分子複合体微粒子を用いて、機能性たんぱく質及び機能細胞、特に血小板、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs)、脂肪組織由来間葉系細胞 (ASCs) のキャリアとしての可能性を検討し、機能性たんぱく質及び細胞のための局所投与用デリバリーシステムの研究を実施する。

(2) 育毛治療に次いで多血小板血漿 (PRP) 含有 F/P M/NPs の皮膚移植や皮弁領域での適用を手始めに、難治性創傷治療及び虚血性疾患治療への適用までを防衛医科大学校倫理委員会の指導下で、医師主導の臨床実験の実施により、その有用性及び安全性を評価して、臨床現場での実用化を目

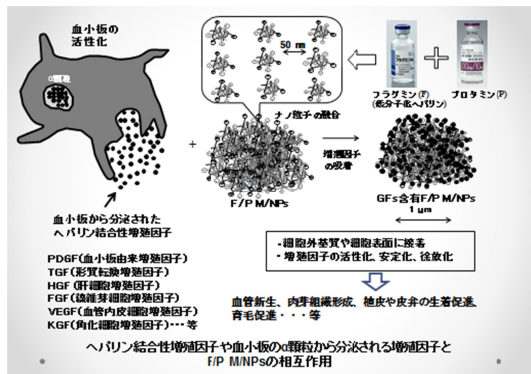
指す。

(3) ASCs、BMSCs、血球前駆体細胞 (HPCs) の培養において、フィーダー細胞に代わる機能性マトリックスとしての F/P M/NPs の適用を目指す。F/P M/NPs はガラスやプラスチック表面へのコーティングが可能なることから、本複合体コートプレートを機能性マトリックスとして用い、低(無)血清培地で適切なサイトカインを添加・吸着させることでヒト線維芽細胞、内皮細胞、ASCs、BMSCs、HPCs を効率的に培養及び特異的分化誘導を可能にする最適な低(無)血清培養法を確立する。

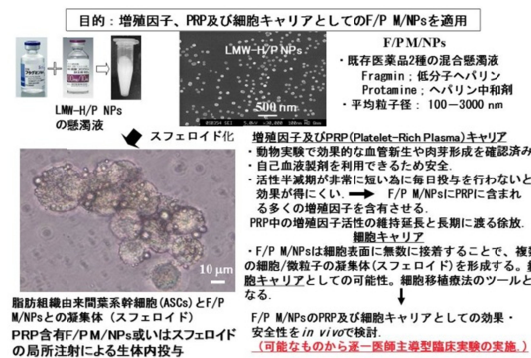
3. 研究の方法

我々は F/P M/NPs をキャリアとして既に臨床使用されている FGF-2、HGF 及び PRP 由来サイトカインを使用した血管新生療法の研究を実施する。FGF-2、HGF 等のヘパリン結合性サイトカインは、硫酸基を有したヘパリノイドと相互作用すると構造が安定化し、それらの活性が保護・促進される。そこでヘパリノイドを構成物質とした薬剤キャリアを作製することで、FGF-2、HGF 及び PRP 中のヘパリン結合性サイトカインの活性の促進とともに長期間に渡る安定化により、効果的な血管新生や肉芽形成が誘導できるかを評価する。既存の医薬品であるフラグミンとその中和剤であるプロタミンは、それぞれの電荷的性質から複合体を形成し、極細注射針を容易に通過する 0.1 - 3 μm 程度の F/P M/NPs となる。この微粒子は、局所注射による出血傾向等の副作用はなく、*in vivo* においてヘパリン結合性サイトカインと良好に相互作用して長期に渡り活性を維持させる。そこで局所単回注入

を行った健常マウスの当該部位で、血管新生と肉芽形成の促進、難治性創傷治癒促進、血流改善、育毛促進効果を観察する（下図参照）。



また ASCs や BMSCs との相互作用を通じて、短時間(1h 以内)で細胞・マイクロ粒子凝集体(スフェロイド)を形成させ、浮遊培養条件下での細胞の生存性、幹細胞移植療法の幹細胞キャリアとしての使用の可否を評価する(下図参照)。

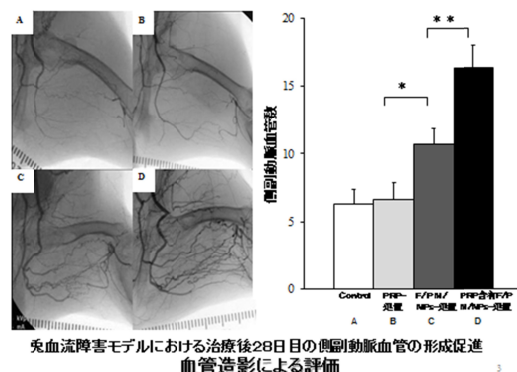


さらに F/P M/NPs は、ガラスやプラスチック表面のコーティング材としての有効性も示されており、各種幹細胞の *in vitro* 増殖・分化を誘導するため、適当なサイトカインを吸着させた機能性人工マトリックス材としての適用を検討する。

4. 研究成果

我々は F/P M/NPs をキャリアとして、既に臨床使用されている FGF-2 (3,9)、HGF (4)

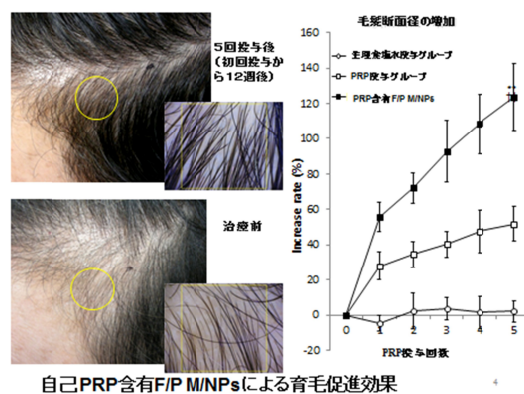
及び PRP 由来機能性タンパク質を使用した血管新生療法について研究を行ってきた。FGF-2、HGF 等のヘパリン結合性機能性タンパク質は、硫酸基を有したヘパリノイドと相互作用すると構造が安定化し、それらの活性が持続・促進されることから、ヘパリノイドを構成物質とした有効な薬剤キャリアを作製することが可能となった。FGF-2、HGF 及び PRP 由来機能性タンパク質の活性の促進とともに長期に渡る活性の維持・安定化により、血流障害モデルにおいて効果的な血管新生や肉芽形成が誘導できることを示した。既存の医薬品である低分子化ヘパリンとその中和剤であるプロタミンは、それぞれの電荷的性質から複合体を形成し、極細注射針を容易に通過する安定なマイクロ/ナノ粒子となる。この LMW-H/P M/NPs は、局所注射による出血傾向等の副作用はなく、*in vivo* において FGF-2、HGF 及び PRP 由来機能性タンパク質と良好に相互作用して活性を長期に渡り維持・安定化させる。局所単回注入を行った健常兔の当該部位では血管新生(側副動脈形成)(下図参照)(3)と肉芽形成の促進効果、創傷治癒促進効果(14,15)、皮弁や脂肪片の生着促進効果を観察した(16)。



また間葉系幹細胞との相互作用により、

短時間(1h 以内)で細胞・マイクロ粒子凝集体(スフェロイド)を形成し、浮遊培養条件下でも細胞の生存性を高めることから、幹細胞移植療法の幹細胞キャリアとして自己血漿と併用した (1,2)。さらに F/P M/NPs は、ガラスやプラスチック表面のコーティング材 (10,12,13) や 3 次元培養に用いる血漿ゲル材 (4,5) としても有効性が認められていることから、各種幹細胞の *in vitro* 増殖・分化を誘導するため、適当なサイトカインを吸着させた機能性人工マトリックス材としても適用できた。一方、混合濃度や混合比を制御しデキストランを添加することで、凍結乾燥製剤として保存・再溶解が可能となり、平均粒子径が 100 nm 以上で 250 nm 未満の静脈内注射もできるナノ粒子 (F/P M/NPs) を製造する事に成功した。

美容形成外科領域の育毛治療については、本年防衛医科大学校倫理委員会の実施承認を受けて、医師主導の臨床実験を実施し、有効性及び安全性を明らかにした。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (査読のある英文原著論文のみ記載) (計 16 件)

1. Sumi Y, **Ishihara M**, Kishimoto S, Takikawa M, Hattori H, Takikawa M, Doumoto T, Azuma R,

Nakamura S, Fujita M, Kiyosawa T. Effective wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats by adipose-derived stromal cell-transplantation in plasma-gel containing fragmin/protamine microparticles. *Annals of Plastic Surgery*, 72, 113-120, 2014. (Doi: 10.1097/SAP.000000000000014)

2. Sumi Y, **Ishihara M**, Kishimoto S, Takikawa M, Doumoto T, Azuma R, Nakamura S, Hattori H, Fujita M, Kiyosawa T, Transplantation of Inbred Adipose-Derived Stromal Cells in Rats with Plasma Gel Containing Fragmin/Protamine Microparticles and FGF-2. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 101B, 784-791, 2013. (Doi: 10:1002/jbm.b.32882)

3. Fujita M, Horio T, Kishimoto S, Nakamura S, Takikawa M, Nakayama T, Yamamoto Y, Shimizu M, Tachibana S, **Ishihara M**. Effects of platelet-rich plasma-containing fragmin/protamine microparticles in enhancing endothelial and smooth muscle cell growth and inducing collateral vessels in a rabbit model of hindlimb ischemia. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 101, 36-42, 2013. (Doi: 10.1002/jbm.b.32808)

4. Kishimoto S, **Ishihara M**, Nakamura S, Takikawa M, Fujita M, Sumi Y, Kiyosawa T, Sato T, Kanatani Y. Fragmin/protamine microparticles to adsorb and protect HGF and to function as local HGF carrier in vivo. *Acta Biomaterialia*, 9, 4763-4770, 2013. (Doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.003)

5. Kishimoto S, **Ishihara M**, Takikawa M, Takikawa M, Sumi Y, Nakamura S, Fujita M, Sato T. Three-dimensional culture using human plasma-medium gel with fragmin/protamine microparticles for proliferation of various human cells. *Cytotechnology*, 12 pages, 2013. (Doi: 10.1007/s10616-013-9628-5)

6. Hattori H, Amano Y, Habu-Ogawa Y, Ando T, Takase B, **Ishihara M**. Angiogenesis following cell injection is

- induced by an excess inflammatory response coordinated by bone marrow cells. *Cell Transplantation*, 22, 2381-2391, 2013. (Doi: 10.727/096368912x658863)
7. Nakamura S, Maehara T, Watanabe S, **Ishihara M**, Masahiro Sato. Improvement of hydrodynamics-based gene transfer of nonviral DNA targeted to murine hepatocytes. *Biomed Research International*, (DOI: 10.1155/2013/928790)
8. Hagiwara K, Kishimoto S, **Ishihara M**, Koyama Y, Mazda O, Sato T. In vivo gene transfer using pDNA/chitosan/chondroitin sulfate ternary complexes: Influence of chondroitin sulfate on the stability of freeze-dried complexes and transgene expression in vivo. *Journal of Gene Medicine* 15 (2), 83-92, 2013. (Doi: 10.1002/jgm.2694)
9. Nakamura S, Megumi Takikawa, **Ishihara M**, Nakayama T, Kishimoto S, Isoda S, Ozeki Y, Sato M, Maehara T. Delivery system for autologous growth factor fabricated with low-molecular-weight heparin and protamine to attenuate ischemic hind-limb loss in a mouse model. *J Artif Organ* 15, 375-385, 2012. (Doi: 10.1067/s10047-012-0658-0)
10. Kishimoto S, **Ishihara M**, Mori Y, Takikawa M, Sumi Y, Nakamura S, Sato T, Kiyosawa T. Three-dimensional expansion using plasma-medium gel with fragmin/protamine nanoparticles and FGF-2 to stimulate adipose-derived stromal cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *BioResearch Open Access* 1, 314-323, 2012. (Doi: 10.1089/biores.2012.0251)
11. Nakamura S, Takikawa M, **Ishihara M**, Nakayama T, Kishimoto S, Isoda S, Yuichi Ozeki, Sato M, Maehara T. Delivery system for autologous growth factors fabricated with low-molecular-weight heparin and protamine to attenuate ischemic hindlimb loss. *Tissue Engineering Part A*, 18, 2239-2247, 2012. (Doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0741).
12. Kishimoto S, **Ishihara M**, Mori Y, Takikawa M, Hidemi Hattori, Shingo Nakamura, Toshinori Sato. Effective expansion of human adipose-derived stromal cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured on a fragmin/protamine nanoparticles-coated substratum with human platelet-rich plasma. *J. Tissue Engineer Reg Med* 2012. (Doi: 10.1002/term.1488. 2012).
13. Kishimoto S, **Ishihara M**, Kanatani Y, Nambu M, Takikawa M, Sumi Y, Nakamura S, Mori Y, Hattori H, Tanaka Y, Sato T. Selective Expansion of CD34+ Cells from Mouse Bone Marrow Cultured on LH/P MP-Coated Plates with Adequate Cytokines. *J. Tissue Engineer*, On line 30 Oct. 1-8 2011. (Doi:10.1177/2041731411425419)
14. Takikawa M, Nakamura S-I, Nakamura S, Nambu M, **Ishihara M**, Murakami K, Kishimoto S, Sasaki K, Yanagishita S, Azuma R, Yamamoto N, Kiyosawa T. Stimulation of vascularization and granulation tissue formation by growth factors in human platelet-rich plasma (PRP) containing fragmin/protamine micro particles (F/P MPs). *J. Biomed. Mater. Res (B)*, 97B (2), 373-380, 2011. (Doi: 10.1002/jbm.b.31824).
15. Nambu M, **Ishihara M**, Kishimoto S, Yanagibayashi S, Yamamoto N, Azuma R, Kanatani Y, Kiyosawa T, Mizuno H. Stimulatory Effect of autologous adipose tissue-derived stromal cells in an atelocollagen matrix on wound healing in diabetic db/db mice, SAGE-Hindawi Access to Research, *Journal of Tissue Engineering*. 2011, Article ID 158105, 7 pages, (Doi:10.4061/2011/158105).
16. Takikawa M, Sumi Y, **Ishihara M**, Kishimoto S, Nakamura S, Yanagibayashi S, Hattori H, Azuma R, Yamamoto N, Kiyosawa T. PRP&F/P MPs improved

survival of dorsal paired pedicle skin flaps in rats,
Journal of Surgical Research, 170 (1), 189-190, 2011.

(Doi: 1016/j.jss.2011.05.051).

[学会発表] (計 10 件)

1. **石原雅之**、中村伸吾、瀧川真人、服部秀美、藤田真敬、増殖因子キャリアとしてのフラグミン/プロタミン/ナノ粒子 .第 13 回日本再生医療学会総会、京都国際会館、2014.03.
2. 鷲見友紀、**石原雅之**ら . 糖尿病創傷モデルにおける 3 次元培養脂肪組織由来幹細胞の治癒促進効果 : フラグミン/プロタミン微粒子の活用 . 第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会、新潟コンベンションセンター、2013.11.
3. **石原雅之**、服部秀美、藤田真敬、中村伸吾 . PRP キャリアとしての低分子化ヘパリン/プロタミン粒子の適用 . 第 51 回日本人工臓器学会大会、パシフィコ横浜、2013.09.
4. 中村伸吾、**石原雅之**ら . 多糖類を用いたマウス生体組織へのタンパク質・遺伝子運搬システムの検討 . 第 32 回日本糖質学会年会、大阪・国際交流センター、2013.07.
5. **石原雅之**、岸本聡子、中村伸吾ら . 増殖因子キャリアとしてのフラグミン/プロタミン・ナノ粒子 . 第 12 回日本再生医療学会大会、パシフィコ横浜、2013.03.
6. **石原雅之**、鷲見友紀、瀧川恵美ら . PRP に含まれる増殖因子キャリアとして Fragmin/protamine microparticles の適用 . 第 42 回日本創傷治癒学会、北海道・札幌、2012.12.
7. 藤田真敬、**石原雅之**ら . フラグミン・プロタミンマイクロ粒子含有多血小板血漿によるウサギ後肢虚血モデルの血管新生 . 第 50 回日本人工臓器学会大会、アクロス福岡、2012.11.
8. **石原雅之**、岸本聡子、中村伸吾ら . 増殖因子キャリアとしてのフラグミン/プロタミン・マイクロ・ナノ粒子の応用 . 日本バイオマテリアル学会

シンポジウム、仙台国際センター、2012.11.

9. **石原雅之**、岸本聡子、鷲見友紀ら . フラグミン/プロタミン/ナノ粒子含有低濃度血漿・培地ゲルを用いた間葉系幹細胞の三次元培養及び細胞移植 .
10. **石原雅之**、岸本聡子、服部秀美ら . 増殖因子及び細胞キャリアとしての低分子ヘパリンとプロタミンからなる微粒子 . 第 31 回日本糖質学会年会、鹿児島市民文化ホール、2012.08.

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称 : 3 次元細胞培養方法及び細胞移植用組成物 .

発明者 : **石原雅之**、中村伸吾、藤田真敬、服部秀美

権利者 : 防衛省技術研究本部長

種類 : 特許

番号 : 特許願 2012 - 171027 .

出願年月日 : 平成 24 年 7 月 20 日

国内外の別 : 国内

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

石原 雅之 (Ishihara, Masayuki) 防衛医科大学校・防衛医学研究センター・教授

研究者番号 : 10508500

(2) 研究分担者

石原 美弥 (Ishihara, Miya) 防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号 : 30505342

前原 正明 (Maehara, Masaaki) 防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号 : 70124956

清澤 智晴 (Kiyosawa, Tomoharu) 防衛医科大学校・病院・准教授

研究者番号 : 90221217