

医療分野研究成果展開事業/研究成果最適展開支援プログラム (AMED・A-STEP)

平成 27 年度成果報告書 (公開)

プロジェクトリーダー (企業責任者)	ゲンゼ株式会社 QOL 研究所長 鈴木 昌和
研究責任者	公立大学法人大阪市立大学 大学院医学研究科 准教授 福本 真也
参加機関	ゲンゼ株式会社、公立大学法人大阪市立大学、学校法人近畿大学
研究開発課題	虚血下肢の治療を目的とした Injectable cell scaffold の非臨床試験

1. 研究開発の目的

近年、糖尿病や慢性腎不全患者の増加に伴い、その合併症である末梢動脈疾患(閉塞性動脈硬化症等)が増加している。これら四肢末梢動脈の高度の狭窄や閉塞により、難治性潰瘍や壊疽へ至ると、生命の危機に至ることもある。重症患者への治療法としては四肢切断以外の選択肢がないことも多く、四肢を切断された患者では、QOLの低下や生命予後の不良など、治療後においても様々な負担が患者に残ることになる。そのため、四肢を切断せずに重症患者を治療するために、血管新生療法が研究されている。骨髄や末梢血中から採取した自己単核細胞の移植を行う細胞移植治療では、有効性が近年示されているが、その有効性は未だ十分なものではない。そこで本提案課題では、この細胞移植治療に注目し、その細胞移植療法の有効性を高めるため、細胞を接着させて移植する基材“Injectable cell scaffold (ICS)”を開発し、ICS と単核細胞を用いた血管新生療法を開発することを目的とした。

2. 研究開発の概要

これまでの研究開発において、ICS が骨髄単核細胞をその表面に担持することで、移植細胞が組織局所に長期間維持され、骨髄細胞単独移植の場合と比べて著明に血管新生効果が向上し、細胞移植治療による下肢切断回避効果を飛躍的に増幅することを明らかにしてきた。今回の研究開発では、臨床試験に向けて非臨床試験を実施することを主たる目的とし、信頼性調査に対応した方法で行う。また、動物モデルで ICS の救肢効果を評価するのみでなく、移植中長期後の組織観察を行い、ICS の分解挙動を解析するとともに安全性の評価も行う。さらに、製品の保管試験を行い、長期の安定性を評価する。

3. 研究開発の成果 (平成 27 年度)

(1)ガンマ線滅菌 ICS の物性評価【ゲンゼ株式会社、大阪市立大学】

大阪市立大学での動物実験の結果から虚血下肢の血流改善には ICS の形状も影響することがわかってきた。救肢効果の得られなかった ICS の表面は大きな凹凸形状を有していたが、救肢効果が高かった ICS は表面形状の凹凸が少なく、真球に近い形状を有していた(図1)。この形状を数値化するために、湿式フロー式粒子径・形状分析装置で解析を行ったところ、ロット①の円形度はロット②の円形度よりも低かった。この結果から、ロット②の方が表面の凹凸形状が少なく、細胞接着性が高いと推察された。

このロット②の ICS について、ガンマ線滅菌が血管新生効果に影響を与えるかを検討した。ガンマ線滅菌前後の ICS ロット②をそれぞれマウス骨髄細胞と混合し、マウスモデルの虚血肢に共移植した後、

下肢壊死の有無を28日間観察した。その結果を Kaplan-Meier 法にて解析すると、Log-rank test にてガンマ線滅菌が救肢効果に有意な影響を与えないこと($P>0.05$)が示された(データ未掲載)。

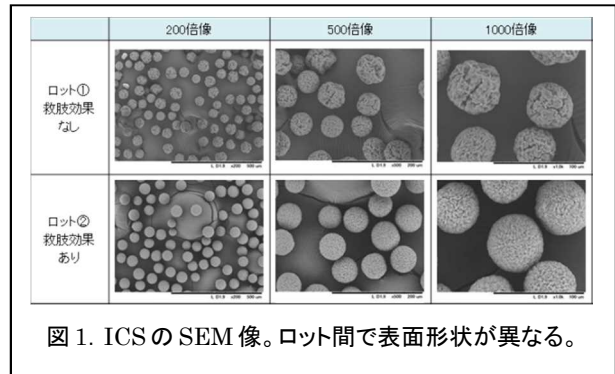


図1. ICSのSEM像。ロット間で表面形状が異なる。

(2)原料の解析【ゲンゼ株式会社、近畿大学】

原料であるハイドロキシアパタイト(HAp)のロット間で、作製した ICS の収率、円形度などが異なることがあったため、HAp の物性解析を行った。HAp の解析を FT-IR で行ったところ、製造工程中の副産物が混在しているロットがあった。この副産物が ICS と単核細胞との接着を阻害すると推察し、副産物を含まない HAp を使用することにした。

(3)ICSの組織内分解過程の解析【大阪市立大学】

マウス下肢大腿部に ICS を筋注移植して、経時的に移植組織を回収し、ICS の分解過程と ICS 周囲への白血球(CD45)とマクロファージ(Mac3)の集積状態を免疫染色法にて観察した。移植1年後にはほとんどの ICS が組織内で分解・消失するが、一部の ICS は26ヶ月後も残存していた。しかし、残存していた ICS も分解が進んでおり、通常形態の ICS は組織中に認められなかった。2年間に渡り、ICS 周囲にマクロファージを中心とした異物反応はあるものの、組織傷害性を認めず、ICS が吸収消失するにつれて炎症反応も消失する傾向を示した(図2)。

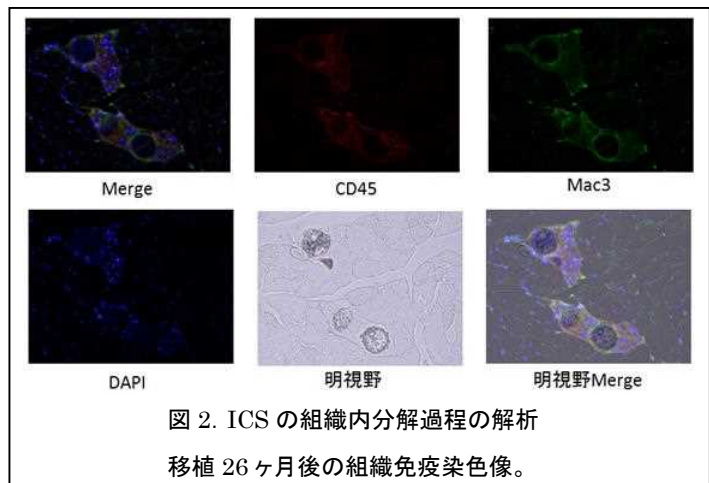


図2. ICSの組織内分解過程の解析
移植26ヶ月後の組織免疫染色像。

(4)ICSの加水分解試験【近畿大学】

ICS の筋肉組織内での細胞接着性を検討するために、ICSをPBS中37℃に2週間および4週間浸漬し、ICS表面の HAp 単結晶の被覆率変化を評価した。その結果、浸漬4週間後でも ICS 表面の HAp は80%以上保持されており、筋肉組織内で細胞を保持できると推察できた(図3)。

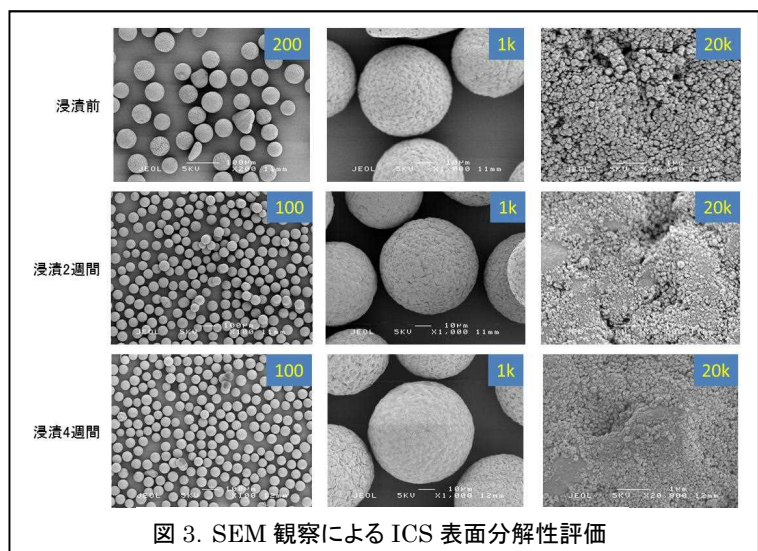


図3. SEM観察によるICS表面分解性評価