効果的な心筋細胞シート移植のための VEGF 徐放ファイバーマットの設計

慶應義塾大学 薬学部*

長瀬健一*・金澤秀子*

Design of VEGF Releasing Fiber Mat for Effective Transplantation of Cardiomyocyte Sheets

Recently, cell transplantation therapy using cellular tissue has been used as an effective therapy for patient. In order to improve the efficacy of the cellular tissue transplantation, vascular endothelial growth factor (VEGF) releasing fiber mat was developed. Using the fiber mat, six layered cardiomyocyte sheets can be transplanted at once, because the local release of VEGF induced the vascularization into the transplanted stacked cardiomyocyte sheets. In this article, the design strategy of the VEGF releasing fiber mat was introduced with the background of cellular tissue transplantation.

近年、細胞シートなどの *in vitro* で作製した細胞組織を移植する治療法が効果的な治療法として展開されている。筆者らは細胞組織を移植する際に、移植組織に血管導入を行い、効果的な細胞組織の生着を促す血管内皮細胞増殖因子(VEGF)徐放ファイバーマットを開発した。このファイバーマットを用いることで、通常では生着が難しい細胞組織の移植への応用が期待される。本稿では、この VEGF 徐放ファイバーマットの設計戦略を細胞組織移植の現状と併せて紹介する。

Kenichi Nagase*, Hideko Kanazawa*

Keywords: Cell transplantation, VEGF, Fiber mat, Nano particle

1. はじめに

再生医療において、細胞を生体内に移植する治療法が有効なアプローチとして確立しつつある。この治療法において、*in vitro* で細胞組織を作製し、生体へと移植する治療法が注目を集めている。この方法では、細胞の懸濁液を移植する場合と比較して、細胞機能、細胞生着率を改善できる場合もあるが、一方で、細胞活性が高い細胞から構成される細胞組織を用いた場合は、細胞組織の虚血部位に壊死を起こすなどの問題が生じる。そこで本稿では、移植した細胞組織への血管導入を促進させるために、細胞組織の移植部位で血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を徐放するファイバーマットについて、その設計戦略について紹介する。

2. 細胞移植の方法

細胞移植療法ではさまざまな細胞の移植方法が存在する。最も汎用的な細胞移植方法は、細胞懸濁液を注射により体内に移植する方法である¹⁾。この方法では、細胞懸濁液の調製が簡便であり、比較的侵襲に細胞を投与することができる。しかし、この方法は、細胞が患部に効果的に留まらないため、十分な治療効果が得られない場合がある。そこで、生体外で細胞の組織を作製してから移植することで治療を行う方法が検討されている。代表的な方法としては、生分解性高分子から構成される細胞足場(スキャホールド)を用いた方法があげられる²⁾。この方法では、ポリカプロラクトン(PCL)やポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(PLGA)などの生分解性高分子を用いて、任意の形状のスキャホールドを設計する。作製したスキャホールドに細胞を播種し、生体に移植することで任意の形状の細胞組織を作製

* Faculty of Pharmacy, Keio University

することが可能となる。しかし、この方法では、スキャホールドが細胞組織内のある程度の体積を占めているため、高密度な細胞組織を作製することが難しい。そこで、スキャホールドを用いない細胞シートやスフェロイドなどの細胞組織の作製が検討されている^{3,4)}。これらの細胞組織は細胞のみで構成されるため、高密度な細胞組織の作製が可能となる。

3. 細胞シートの特性と応用例

スキャホールドを用いない細胞組織の中で、臨床応用が盛んに行われているのが細胞シートである。細胞シートは、細胞培養皿の表面に温度応答性高分子であるポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)を修飾した温度応答性培養皿によって作製される(図1)⁵⁾。ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)は、温度37℃で疎水性に、20℃で親水性に変化する⁶⁾。このため、温度応答性培養皿は37℃で疎水性となり細胞を接着させる。一方、温度を低下させることで、培養皿表面が親水性になるため細胞が脱着を起こす⁷⁾。この性質を利用し、温度37℃で温度応答性培養皿に細胞を播種し、コンフルエント状態になるまで細胞を培養する。その後、温度を低下させることでシート状の細胞組織を回収することができる。この細胞シートでは、通常のトリプシンなどによる

酵素処理による回収とは異なり、細胞間結合、細胞外マトリクスが維持されたままの状態での回収することができる。この細胞シート底面に維持された細胞外マトリクスが糊のような働きをし、生体組織に貼り付けるだけで移植を行うことができる。また、細胞間結合が維持されているため、移植後の細胞が移植部位に留まりやすいという利点がある⁸⁾。

これらの観点から細胞シート移植は有効な細胞組織の移植方法として確立されており、さまざまな疾患に対する治療効果が明らかになっている。例えば、口腔粘膜上皮の細胞を用いた細胞シートによる角膜上皮の再生⁹⁾、骨格筋芽細胞を用いた細胞シート移植による心機能の改善¹⁰⁾、内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)による食道がんの腫瘍部位切除後の食道狭窄を防ぐ口腔粘膜細胞シート移植¹¹⁾、歯根膜細胞を用いた細胞シートによる歯周組織再生¹²⁾、軟骨細胞シートによる膝関節軟骨の再生¹³⁾、線維芽細胞シートを用いた肺気漏の治療¹⁴⁾、鼻粘膜上皮細胞シート移植による中耳粘膜の再生¹⁵⁾などの治療において、すでに臨床応用が行われている。

また、細胞シートは積層化により高密度な細胞組織を作製可能であり¹⁶⁾、積層する細胞シートの組み合わせでさまざまな機能性組織を作製することができる。肝臓の細胞から構成される肝細胞シートと内皮細胞シートを積層化により重ね合わせることで、

図1 温度応答性培養皿と細胞シートの作製

(A) 温度応答性培養皿上での細胞の接着・脱着。(B) 温度応答性培養皿を用いた細胞シート作製。

図2 心筋細胞シート積層枚数の違いによる虚血の模式図

肝細胞シートの機能を向上させ、アルブミンを長時間分泌させる機能性肝組織の作製が可能である¹⁷⁾。また心筋細胞シートの積層化により、強い拍動を示す心筋組織の構築が可能となる¹⁸⁾。しかし、心筋細胞のような活性の高い細胞種から構成された細胞シートを積層化して移植した場合、移植可能な細胞シートの積層枚数に限界があることが示されている¹⁹⁾。積層化心筋細胞シートをラットの皮下に移植する検討では、1層から3層までの積層化心筋細胞シートは移植後に生着することが示されているが、4層以上では3層と同様の厚さの心筋組織しか生着しないことが示されている¹⁹⁾。これは、心筋細胞シートの積層枚数が多くなるに従い、十分な酸素、栄養素が行きわたらず壊死を起こすためと考えられている(図2)¹⁹⁾。そこで、4層以上の積層化心筋細胞シートを移植する際には、一度、3層積層化心筋細胞シートを移植し、積層化心筋細胞シート内に血管が導入されるのを待ってから、さらに3層の積層化心筋細胞シートを繰り返し移植する方法や¹⁹⁾、生体組織から作製した血管床²⁰⁾、およびコラーゲンをういた血管床²¹⁾を用いて積層化心筋細胞シートを *in vitro* で培養し、積層化心筋細胞シート内への血管導入を待ってから徐々に積層化させる方法がある。これらの手法により、4層以上の積層化心筋細胞シートを移植することができるが、血管導入、積層化の工程を複数回繰り返す必要があり、1度に4枚以上の心筋細胞シートを積層化し、直ちに移植を行うことはできない。

4. 細胞増殖因子を細胞シート近傍に供給するファイバーマットの作製

そこで、移植した心筋細胞シートに素早く血管を導入することで、壊死を防いで効果的な細胞組織の移植を行うという発想に至った。血管形成を促す因子として、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)が有効であることが知られている^{22,23)}。そこで、移植した心筋細胞シート近傍で VEGF を供給するファイバーマットの開発を行った。このファイバーマットに求められる条件として、素早い VEGF の放出が求められる。通常、体内に移植した積層化心筋細胞シートは1日以内に壊死が始まる。このため、迅速な VEGF 供給を移植部位に行い積層化心筋細胞シートへの血管導入を行う必要がある。そこで VEGF を担持する物質として生分解性高分子のポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(PLGA)のナノ粒子を用いた。PLGA は体内に移植すると徐々に分解され、内包されている物質を放出する。また、内包された物質の放出速度は PLGA 粒子の分解速度に依存し、PLGA 粒子の分解速度は、PLGA 粒子の表面積、および PLGA の乳酸とグリコール酸の共重合組成により異なる。最も分解速度が速くなる組成比は、乳酸：グリコール酸=1：1であるため、この比率の PLGA を用いた。また、PLGA の分解速度を上げるために、表面積を大きくするため、エレクトロスプレー法により粒子径の小さいナノ粒子を作製した(図3A)^{24,25)}。

さらに、移植時の操作性を考慮し、VEGF を内包した PLGA 粒子を担持するために、ポリビニルアルコール(PVA)から構成されたファイバーマットをエレクトロスピンニング法により作製した(図3A)。PVA のファイバーマットは親水性であり、移植後に生体組織に馴染みやすい特性を有する。これにより、PVA ファイバーマットに担持された PLGA ナノ粒子が分解されやすくなることが期待できる。前述の組織工学で用いる細胞足場材料として使用されるファイバーマットは、通常、疎水性のポリプロラクトン(PCL)もしくは PLGA から作製される場合が多く、細胞懸濁液を浸透させるために、エタノール等に浸漬し、表面を親水性にしておか

図3 VEGF徐放ファイバーマットの作製と積層化心筋細胞シートの移植
(A) VEGF徐放ファイバーマットの作製。(B) 積層化心筋細胞シートと VEGF徐放ファイバーマットの移植。

図4 VEGF徐放ファイバーマットの形態と積層化心筋細胞シートの移植
(A) VEGF-PLGA ナノ粒子担持PVA ファイバーマットのSEM画像。(B) VEGF徐放ファイバーマットからの VEGF放出挙動(37℃のPBS中で測定)。

ら行う。この操作と同様に、PLGA粒子を担持したファイバーマットをエタノールに浸漬させる場合、ファイバーマットに担持されているPLGA、あるいはPLGAに含有されているVEGFが溶出する可能性がある。これらの観点から、なるべくファイバーマットのエタノールへの浸漬を避けた方がよい。一方、PVAファイバーマットを用いた場合はエタノールに浸漬させる必要がなく、そのまま細胞組織と同時に移植することが可能である。

作製したファイバーマットのSEM画像より、均一な直径のPVAファイバーが紡糸されており、またPLGAナノ粒子が集積し、クラスター状となってPVAファイバーに担持されていることがわかった(図4A)。また作製したファイバーマットのVEGF放出挙動をPBS中で測定したところ、比較的素早いVEGFの放出を確認した(図4B)。これにより、作製したファイバーマットは移植と同時に移植部位での素早いVEGF放出が起こり、積層化心筋細胞シートへの迅速なVEGF供給ができると考えられる。

5. VEGF の局所供給による 積層化心筋細胞シートへの血管導入

作製した VEGF 徐放ファイバーマットを用いた心筋細胞シートへの血管網の導入効率の評価を行った。ラットの胎児の心室細胞から採取した心筋細胞の細胞シートを作製し、6層積層化したものを VEGF 徐放ファイバーマットと同時にヌードラットの皮下に移植した。移植2週間後の積層化心筋細胞シートの拍動機能、血管網構築を評価した。比較対照として、ファイバーマットを移植しない場合、VEGF 含有 PLGA 粒子を担持していないファイバーマットを移植する場合、移植する前の6層積層化心筋細胞シートの場合について併せて評価を行った。また移植の際に片側からの血管導入を評価するために、積層化心筋細胞シートとファイバーマットの上にシリコンシートを配置し、移植部位の反対側からの拡散により酸素供給、血管導入を遮断した。

積層化心筋細胞シートを移植した2週間後の移植部位を観察したところ、移植された積層化心筋細胞シートは宿主組織と異なる拍動を示していることがわかった。また心電図測定から、移植後の心筋細胞シートとヌードラットが異なる心電図が得られ

た。これらの結果より、移植された積層化心筋細胞シートがラットの皮下で心筋組織と同様の機能を有することが示された。また、VEGF 放出ファイバーマットと共に移植した積層化心筋細胞シートは、VEGF を放出しないファイバーマットと比較して強い拍動を示した。このことから VEGF 放出ファイバーマットと同時に移植した場合では、より高い機能を有する心筋組織の構築が可能であることが示唆された。

移植後の積層化心筋細胞シートをラットから回収し、蛍光免疫染色により、心筋組織の厚さ、血管断面積、血管密度を評価した(図5)。心筋細胞を染色する cardiac troponin T で心筋細胞組織を染色し、組織の厚さを評価した。anti-endothelial cell antibody (RECA-1) で血管内皮細胞を染色し、染色された血管内皮細胞の画像をもとに、心筋組織あたりの血管断面積、血管密度を評価した。VEGF を放出するファイバーマットを用いて移植した場合は、移植した積層化心筋細胞シートは、移植する前の積層化心筋細胞シートと同様の厚さの心筋組織を構成していることがわかった。一方、VEGF を放出しないファイバーマットを移植した場合は、移植前の積層化心筋細胞シートのおよそ半分程度の厚

図5 移植後の心筋細胞シート評価
(A) 蛍光免疫染色による心筋組織の評価。Cardiac Troponin T：心筋細胞、RECA-1：血管内皮細胞、Hoechst 33342：細胞核の Merge 画像。
(B) 心筋組織厚さ、血管密度、血管断面積の評価。

さの心筋組織の生着を確認した。既往研究では、3層までの心筋細胞シートが生着されていることが確認されていることから¹⁹⁾、6層移植した積層化心筋細胞シートのうち3層分のみが生着し心筋組織を構築し、残りの3層分の心筋細胞シートは壊死を起こしていると考えられる。

また移植された心筋細胞シート内の血管密度の評価を行ったところ、VEGF放出ファイバーマットを用いた場合と、VEGF放出ファイバーマットを用いない場合で、同様の血管密度を示した。一方、血管断面積の評価ではVEGF放出ファイバーマットを移植した場合では、顕著に大きな血管断面積を有していることがわかった。これにより、移植した積層化心筋細胞シート付近におけるVEGFの局所供給は、血管密度の増加よりも血管断面積を大きくすることで、組織内部への血流を確保し、酸素、栄養素の供給により壊死を防いでいると考えられる。またAzan染色により、移植した心筋細胞組織内に血管が導入されており、血管内に赤血球が確認できたことから、ヌードラットと積層化心筋組織が血管によりつながっていることが示された。これらの結果より、VEGFを放出するファイバーマットを用いることで、移植した心筋細胞シートに効果的に血管網を導入でき、今までに移植できなかった厚さの積層化心筋細胞シートを移植することが可能であることが示された。

これらの結果より、同様の細胞増殖因子を移植部位の局所に供給するファイバーマットを用いることで、従来まで移植しても生着しなかった細胞シート

や細胞組織の生着率を向上させられる可能性がある。例えば、肝細胞など代謝活性の高い細胞から構成された細胞組織の効果的な移植の可能性があげられる。

6. おわりに

VEGFを移植部位に供給するファイバーマットを6層積層化した心筋細胞シートと共に移植することで、積層化心筋細胞シート内に効果的に血管を導入し、生着させることに成功した。これにより従来まで移植できなかった厚い心筋組織を生体内に移植、生着させることが可能である。また、本研究で提案したVEGFの局所供給による血管構築を行うことで、積層化心筋細胞シートのみならず、肝細胞などの代謝活性の高い細胞から構成される細胞組織移植の生着率を向上させられる可能性が考えられる。これにより、細胞組織移植の応用範囲が拡がり新たな細胞移植治療の展開が期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部はJSPS日中韓フォーサイト事業「難治性疾患の再生治療におけるナノバイオマテリアルと送達技術戦略」の助成により行われた。またこの研究は、東京女子医科大学 岡野光夫先生、大和雅之先生、清水達也先生、関根秀一先生、韓国 梨花女子大学 Seung Jin Lee先生との共同研究である。この場を借りて感謝の意を表したい。

文献

- 1) P. Menasché, *et al.*, *Lancet*, **357**, 279-280 (2001)
- 2) R. Langer, *et al.*, *Science*, **260**, 920-926 (1993)
- 3) K. Matsuura, *et al.*, *J. Control. Release*, **190**, 228-239 (2014)
- 4) S.V. Murphy, *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 773-785 (2014)
- 5) K. Nagase, *et al.*, *Biomaterials*, **153**, 27-48 (2018)
- 6) M. Heskins, *et al.*, *J. Macromol. Sci. A*, **2**, 1441-1455 (1968)
- 7) N. Yamada, *et al.*, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **11**, 571-576 (1990)
- 8) H. Sekine, *et al.*, *Tissue Eng. A*, **17**, 2973-2980 (2011)
- 9) K. Nishida, *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **351**, 1187-1196 (2004)
- 10) Y. Sawa, *et al.*, *Surg. Today*, **42**, 181-184 (2012)
- 11) T. Ohki, *et al.*, *Gastroenterology*, **143**, 582-588.e2 (2012)
- 12) T. Iwata, *et al.*, *Regen. Ther.*, **9**, 38-44 (2018)
- 13) M. Sato, *et al.*, *npj Regenerative Medicine*, **4**, 4 (2019)
- 14) M. Kanzaki, *et al.*, *npj Regenerative Medicine*, **2**, 26 (2017)
- 15) K. Yamamoto, *et al.*, *npj Regenerative Medicine*, **2**, 6 (2017)
- 16) Y. Haraguchi, *et al.*, *Nat. Protoc.*, **7**, 850-858 (2012)
- 17) K. Kim, *et al.*, *Biomaterials*, **33**, 1406-1413 (2012)
- 18) T. Shimizu, *et al.*, *Circ. Res.*, **90**, e40-48 (2002)
- 19) T. Shimizu, *et al.*, *FASEB J.*, **20**, 708-710 (2006)
- 20) H. Sekine, *et al.*, *Nat. Commun.*, **4**, 1399 (2013)
- 21) K. Sakaguchi, *et al.*, *Sci. Rep.*, **3**, 1316 (2013)
- 22) D.W. Leung, *et al.*, *Science*, **246**, 1306-1309 (1989)
- 23) N. Ferrara, Vascular Endothelial Growth Factor: Molecular and Biological Aspects. In *Vascular Growth Factors and Angiogenesis*, Claesson-Welsh, L., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1-30 (1999)
- 24) K. Nagase, *et al.*, *Macromol. Biosci.*, **17**, 1700073 (2017)
- 25) I.K. Shim, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **102**, 3639-3648 (2014)