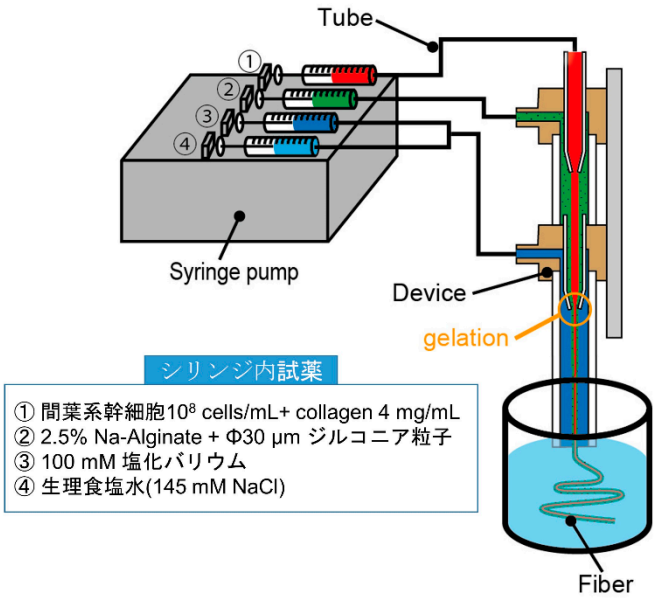
203　細胞含有ハイドロゲルファイバーによる血管内治療	小松　鉄平

【目的】既存治療では克服できない疾患に対して細胞治療が期待され、細胞をシート状もしくはスフェロイド状に培養し体内へ投与する方法が報告されている。一方、細胞をファイバー化し侵襲性の低い血管内治療への応用は行われていない。本研究の目的は、血管内治療に応用可能な細胞を含有したハイドロゲルファイバーを開発することである。また開発したハイドロゲルファイバーを応用可能な脳梗塞モデルと慢性腎障害モデルを作製し、治療効果を証明する。

【方法】二重管の内側にヒト間葉系幹細胞とコラーゲン懸濁液、外側に X 線不透過ジルコニアとアルギン酸ナトリウム水溶液を流し、アルギン酸カルシウムを生成し、直径数百μm のハイドロゲルファイバーを作製した。X 線不透過性を評価するため、6 種類の異なる濃度（10～60%）のジルコニア粒子を含むアルギン酸プレゲル溶液を用いて調製し、デジタルサブトラクション血管撮影装置による X 線画像を撮像した。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞含有 X 線不透過ハイドロゲルファイバーから分泌されるサイトカイン量を経時的に測定し、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞懸濁液と比較した。我々が開発した小型実験動物に対する経皮的尾動脈穿刺による全身の血管イメージング法を応用し、ハイドロゲルファイバーを留置可能なラットの中大脳動脈選択的閉塞脳梗塞モデル（MCAO）、腎葉間動脈選択的閉塞慢性腎障害モデルを作製した。小型霊長類であるマーモセットにおいても、経皮的尾動脈穿刺による全身血管イメージング法を応用し、血管造影を行った。

【結果】ヒト間葉系幹細胞を含有した X 線不透過ハイドロゲルファイバーの作製が可能であった。30%（W/W）以上のジルコニア粒子濃度でファイバーを視認出来ることを確認した。作製したヒト脂肪由来間葉系幹細胞含有 X 線不透過ハイドロゲルファイバーの HGF と TGF-β1 の分泌能は、ヒト間葉系幹細胞懸濁液と同等であった。従来の intraluminal suture モデルと比較し、虚血範囲の再現性が高く、モデル作製成功率が高く、24 時間以内の死亡やクモ膜下出血の発症率が低い、間葉系幹細胞含有ハイドロゲルファイバーを留置可能なラット MCAO を作製出来た。腎障害モデルにおいては、中等度、重度と障害の程度を区別してモデルを作製することが可能であった。小型霊長類であるマーモセットの全身血管、特に脳血管を造影し、ファイバー留置可能なマーモセット脳梗塞モデル作製に必要な血管情報を得た。

ヒト間葉系幹細胞含有 X 線不透過ハイドロゲルファイバーの作製



203. 細胞含有ハイドロゲルファイバーによる血管内治療

小松　鉄平

東京慈恵会医科大学 医学部 内科学講座 脳神経内科

Key words：細胞含有ハイドロゲルファイバー，血管内治療，脳梗塞，腎障害，マーモセット

緒　言

脳卒中発症患者数は年間 23 万人を超え、特に重度要介護を占める割合が高い。さらに、認知症の原因にもなることから、脳卒中治療の発展は、健康寿命の延伸とともに医療費抑制に直接寄与する。このような背景から幹細胞を用いた脳梗塞再生医療の実現が期待され、骨髄単核球細胞や神経幹細胞などの、経静脈もしくは局所移植の臨床試験が複数実施されたが、残念ながら有効性は確立していない。脳梗塞再生医療の実現には、1）細胞投与方法、2）細胞形態、3）細胞視認性に課題がある。

1）細胞投与方法の課題：細胞の投与方法には静脈投与、臓器直接投与、カテーテル動脈投与が候補としてあげられる。静脈投与は侵襲性が低いが、投与した細胞の多くは肺や脾臓に捕捉され、脳内に到達する細胞は数%である。つまり脳への標的指向性が低いことが静脈投与の欠点である。臓器直接投与は、標的指向性が高く細胞治療効果が最大限発揮できるが、侵襲性が高く手術合併症を生じることが欠点である。具体的には脳内出血、てんかんを生じた例が報告されている。カテーテル動脈投与は、経動脈的に標的臓器のみへの治療介入が可能なため標的指向性が高く、内服投与や静脈投与に比較し全身への副作用が少ない。また身体を切開せず皮膚に針を刺すのみで標的臓器へアプローチが可能なため外科手術と比較し侵襲性が低い。どの投与方法が脳梗塞細胞治療に適しているかは分かっていないが、侵襲性、標的指向性において、カテーテル動脈投与は他の投与方法より優れており、細胞投与の新規方法として期待される。

2）細胞形態の課題：細胞は個別にバラバラの状態より、複数の細胞が密着した構造の方が、細胞機能や生着性が改善するため、細胞治療において細胞形態は重要な要素である。三次元培養されたスフェロイドやシートは懸濁液に比較して生着性が高い。しかし三次元培養した細胞組織は、血管との形態親和性が乏しく、静脈投与やカテーテル投与は出来ず、臓器に直接投与しなければならない。三次元構造を有しながら、血管との形態親和性が優れた、新規細胞形態が求められている。

3）細胞視認性の課題：細胞を体内に投与した後、どこへ分布したか観察が出来なくなる（＝視認性が悪い）ことが細胞治療の大きな問題点である。移植した臓器に細胞がどの程度残存し、どの程度機能しているかを評価出来なければ、細胞治療の効果を検証できない。死後のサンプルを用いて、免疫組織化学や分子生物学的手法を行えば細胞分布を評価することは出来るが、生前での評価は困難である。細胞を体内に投与した後、生前死後の経時的な細胞分布を評価することが、細胞治療の効果を検証するうえで重要である。

本研究の目的は、上記の課題を克服可能な新規再生治療法である『細胞含有ハイドロゲルファイバーによる血管内治療』を確立することである。まず血管内治療に応用可能な間葉系幹細胞を含有したハイドロゲルファイバーを開発する。さらに、同ファイバーをラットとマーモセット脳梗塞モデルの脳動脈に留置し神経機能の改善効果を証明するため、ファイバー留置可能なモデルを作製する。また、脳梗塞モデルだけでなくラット慢性腎障害モデルの腎動脈に留置し腎機能の改善効果を証明するため、ファイバー留置可能な慢性腎障害モデルを作製する。本研究の成果は脳梗塞以外の他の臓器不全（腎不全、心不全、肝不全など）にも応用でき、全ての臓器の再生治療を担える可能性がある。

方法および結果

1. ヒト脂肪由来間葉系幹細胞含有X線不透過ハイドロゲルファイバーの作製と評価

二重管の内側にヒト間葉系幹細胞とコラーゲン懸濁液、外側にX線不透過ジルコニアとアルギン酸ナトリウム水溶液を流し、アルギン酸カルシウムを生成し、直径数百μmのハイドロゲルファイバーを作製した（図1）。

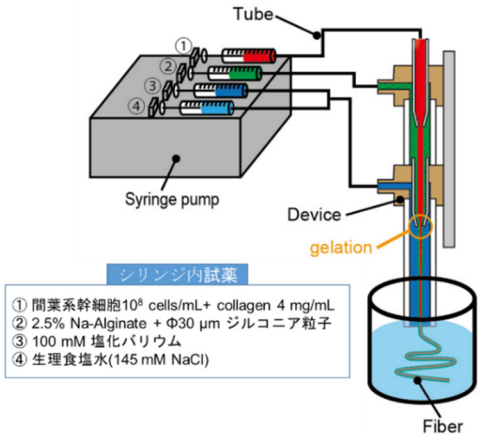


図1. ヒト間葉系幹細胞含有X線不透過ハイドロゲルファイバーの作製
先端がテーパーになっているガラスキャピラリ、角型ガラスキャピラリ、樹脂製のコネクタで構成した二重同軸層流マイクロ流体装置を使用し、X線不透過ハイドロゲルファイバーを作製した。ガラスキャピラリ（外径：1.0 mm、内径：0.6 mm）の先端径を200～600μmに調整した。

X線不透過性を評価するため、デジタルサブトラクション血管撮影装置（DSA）（Artis Zee、Siemens、Germany）により、X線画像を撮像した。マイクロファイバーは、6種類の異なる濃度（10～60%）のジルコニア粒子を含むアルギン酸プレゲル溶液を用いて調製した。30%（W/W）以上のジルコニア粒子濃度でファイバーを視認出来ることを確認した（図2）[1]。

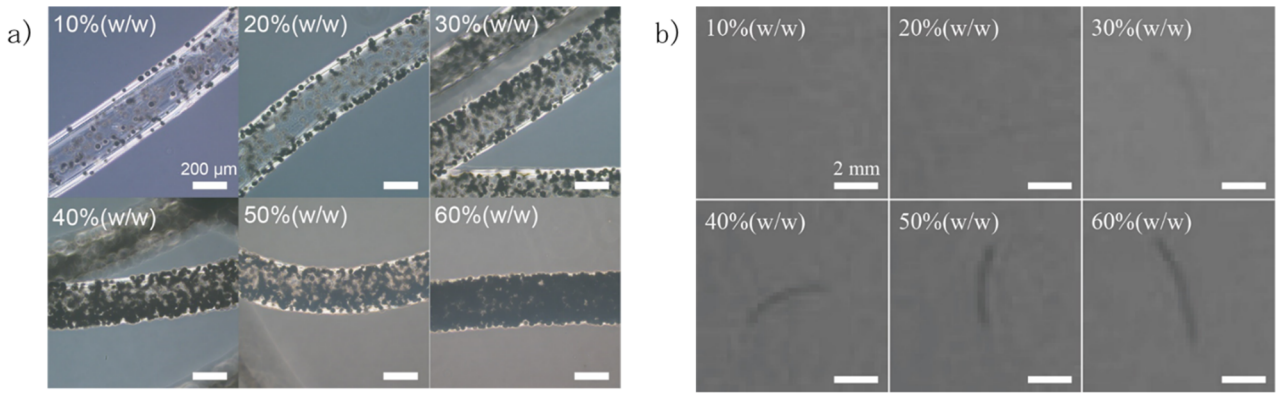


図2. X線不透過ハイドロゲルファイバーのX線視認性評価
a) 作製したX線不透過ハイドロゲルファイバー。
b) 作製したハイドロゲルファイバーをX線で撮像しX線視認性を評価した。

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞含有 X 線不透過ハイドロゲルファイバーから分泌されるサイトカイン量を経時的に測定し、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞懸濁液と比較した。懸濁液と同様に、ハイドロゲルファイバー内の間葉系幹細胞からサイトカインが分泌されることを確認した（図 3）。

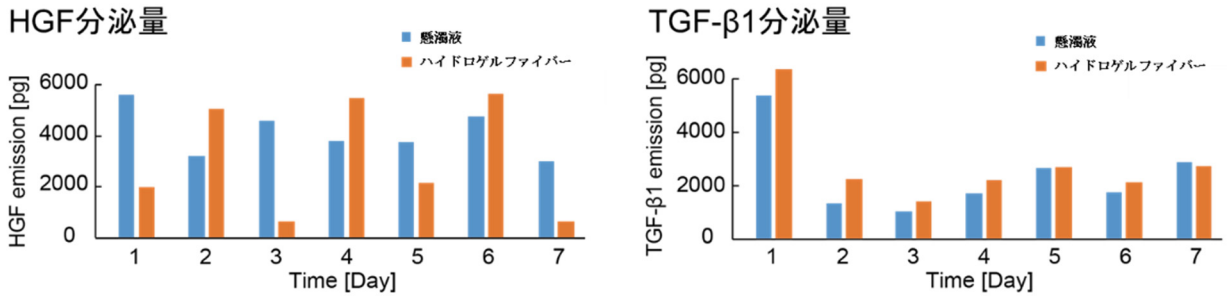


図 3. サイトカイン分泌評価

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞懸濁液とヒト脂肪由来間葉系幹細胞含有 X 線不透過ハイドロゲルファイバーの HGF と TGF-β1 の分泌量を 7 日間連続でそれぞれ測定した。

2. デジタルサブトラクション血管撮影装置を用いたラット脳梗塞モデルの作製

我々が開発した小型実験動物に対する経皮的尾動脈穿刺による全身の血管イメージング法を応用し、ファイバー留置可能なラットの中大脳動脈選択的閉塞脳梗塞モデル（MCAO）を作製した。MCAO 作製 24 時間後の X 線では、塞栓として使用したファイバーの放射線視認性は良好であり、ファイバーの形体も保持されていた。尾動脈穿刺から塞栓終了までの時間は中央値 8.5 分（四分位範囲 6.25～12 分）と短時間にモデル作製可能であった。脳出血など出血性合併症を生じた例はなかった。MCAO 作製 24 時間後の MR angiography では左 MCA のみ描出不良であり、他の主幹脳動脈の血流は保たれていた。脳梗塞体積は中央値 262 mm^3（四分位範囲 260～274 mm^3）と梗塞範囲が安定していた（図 4、表 1）。

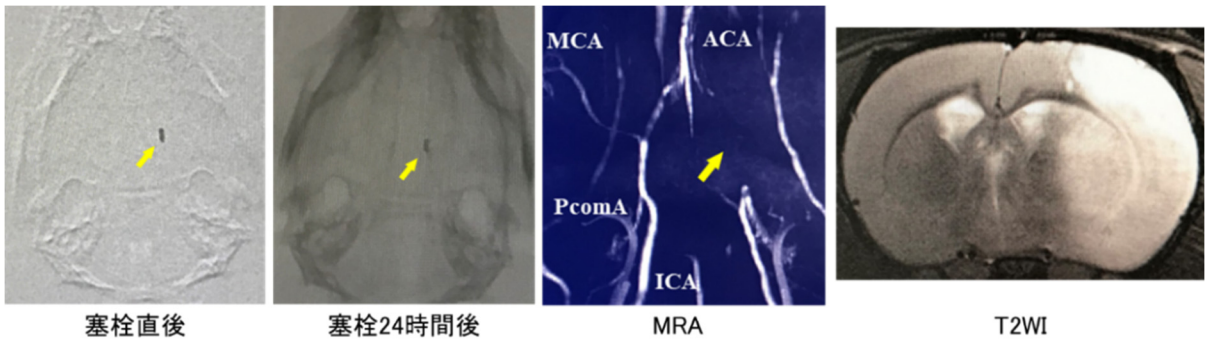


図 4. X 線によるファイバーの視認性と形状評価、MRA、MRI での MCAO 評価

MCAO 作製 24 時間後の X 線では、塞栓として使用したファイバーの放射線視認性は良好であり、ファイバーの形体も保持されていた。MCAO 作製 24 時間後の MR angiography では左 MCA のみ描出不良であり、他の主幹脳動脈の血流は保たれていた。脳梗塞範囲は左 MCA 領域のみと安定していた。

表 1. 汎用されている intraluminal suture モデルと、本モデルとの比較

	Intraluminal sutureモデル	本モデル
アプローチ	頸部切開	尾穿刺
虚血範囲	MCA/ECA/AChA/HTA/PcomA	MCA
モデル作製成功率	10/12 (83%)[1]	10/10 (100%)
24時間後死亡率	1/10 (10%)[1]	0/10 (0%)
クモ膜下出血発症率	8-30%[1-3]	0/10 (0%)
再開通モデル作製	可能	不可能

AChA：前脈絡叢動脈、ECA：外頸動脈、HTA：視床下動脈、MCA：中大脳動脈、PcomA：後交通動脈

本モデルは尾動脈を穿刺するのみのため侵襲性が低い。虚血部位を MCA 選択的に行うことができ、モデル作製成功率が高く、24 時間以内の死亡やクモ膜下出血の発症率が低い［2～4］。

3. デジタルサブトラクション血管撮影装置を用いたラット慢性腎障害モデルの作製

脳梗塞モデル作製と同様に、デジタルサブトラクション血管撮影装置と小口径カテーテルを用いて、経皮的尾動脈穿刺による超低侵襲かつ虚血範囲が安定した腎葉間動脈選択的閉塞慢性腎障害モデルを作製した。モデル作製、1 日後、4 日後、7 日後、14 日後に、血液検査を施行し腎機能を評価した。中等度腎障害、重度腎障害に区別したモデルを作製可能であった（図 5）［1］。

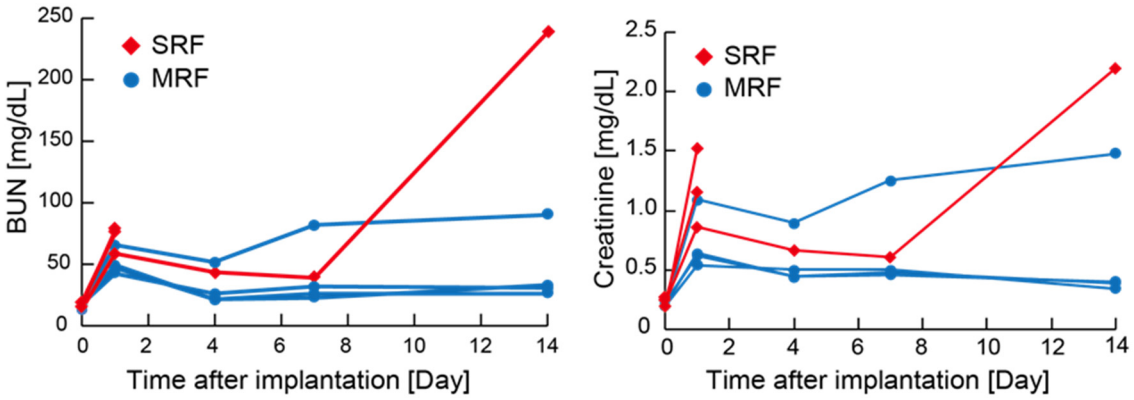


図 5. 選択的腎動脈閉塞による慢性腎障害モデルの BUN と Cr の推移
MRF：mild renal failure、SRF：severe renal failure。

4. デジタルサブトラクション血管撮影装置を用いたマーモセットの全身血管造影

ラットの経皮的尾動脈穿刺による全身の血管イメージング法を応用し、小型霊長類であるマーモセットの全身血管、特に脳血管を造影し、ファイバー留置可能なマーモセット脳梗塞モデル作製に必要な血管情報を得た（図 6）［4］。

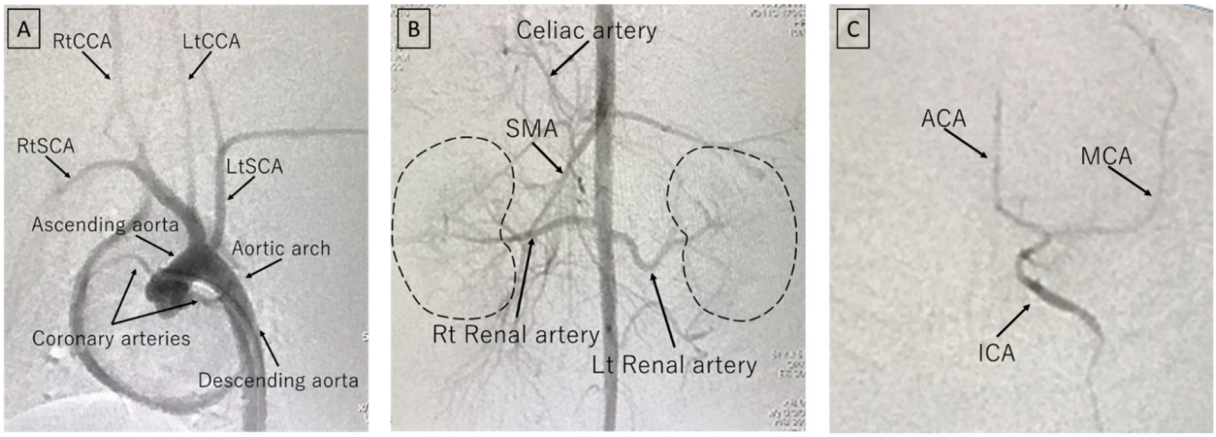


図 6. デジタルサブトラクション血管撮影装置によるマーモセットの血管造影

A：上行大動脈造影、B：腹部大動脈造影、C：左頭蓋内内頸動脈造影。

ACA：前大脳動脈、CCA：総頚動脈、ICA：内頸動脈、MCA：中大脳動脈、SCA：鎖骨下動脈。

考　察

『細胞含有ハイドロゲルファイバーによる血管内治療』に利用可能な、間葉系幹細胞を含有した X 線不透過ハイドロゲルファイバーの開発に成功した。X 線不透過のジルコニアを間葉系幹細胞ハイドロゲルファイバーに含有させても、HGF、TGF-β1 の分泌能が低下しないことを確認した。また、間葉系幹細胞含有ハイドロゲルファイバーを留置可能なラット MCAO とラット慢性腎障害モデルの作製に成功した。我々が開発した MCAO モデルは、従来の intraluminal suture モデルと比較し、虚血範囲の再現性が高く、モデル作製成功率が高く、24 時間以内の死亡やクモ膜下出血の発症率が低い。また腎障害モデルにおいては、中等度、重度と障害の程度を区別したモデル作製に成功した。以上より、この 2 つのモデルは治療介入検証モデルとして優れていると考える。これらの技術により、ラット MCAO や慢性腎障害モデルにおける間葉系幹細胞含有ハイドロゲルファイバーの神経機能改善効果、腎機能改善効果を実証することが可能になる。さらに、小型霊長類であるマーモセットの全身血管造影にも成功したため、今後はマーモセットにも同様のモデルを作製することが可能である。『細胞含有ハイドロゲルファイバーによる血管内治療』は、脳梗塞以外の他の臓器不全（腎不全、心不全、肝不全など）にも応用でき、全ての臓器の再生治療を担える可能性があり、今後も本研究を発展させていきたい（図 7）。

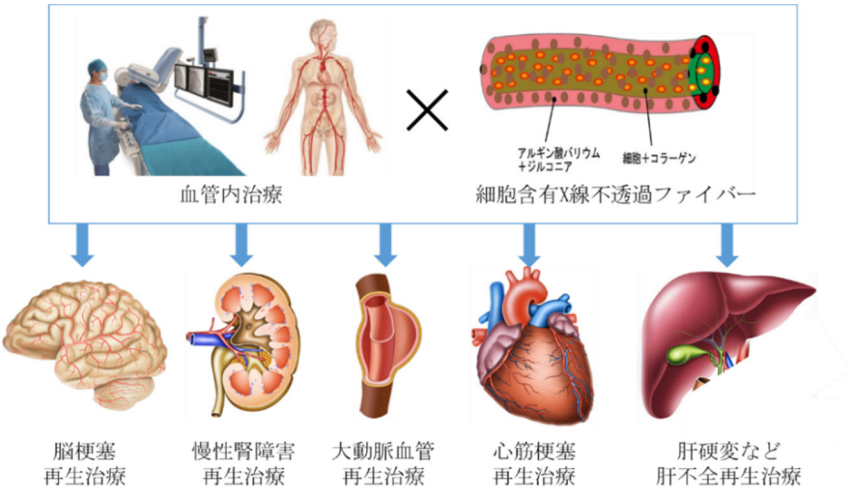


図 7.『血管内治療』×『細胞含有ハイドロゲルファイバー』

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター再生医学研究部の太田裕貴、慶應義塾大学大学院理工学研究科総合デザイン工学専攻尾上研究室の髙倉直輝である。

文　献

1） Takakura N, Ohta H, Komatsu T, Kurashina Y, Hiroka Y, Okano HJ, et al. Vascular embolization of radiopaque hydrogel microfiber using ultra-minimally invasive technique for stage-adjustable renal failure model. Materials & Design. 2022;219:110802. doi: https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.110802.

2） Gerriets T, Li F, Silva MD, Meng X, Brevard M, Sotak CH, et al. The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. J Neurosci Methods. 2003;122(2):201-11. Epub 2003/02/08. doi: 10.1016/s0165-0270(02)00322-9. PubMed PMID: 12573479.

3） Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. Drug Des Devel Ther. 2015;9:3445-54. Epub 2015/07/15. doi: 10.2147/dddt.s56071. PubMed PMID: 26170628; PubMed Central PMCID: 4494187.

4） Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. Stroke. 1998;29(10):2162-70. Epub 1998/10/02. doi: 10.1161/01.str.29.10.2162. PubMed PMID: 9756599.

5） Ohta H, Komatsu T, Muta K, Koizumi M, Iguchi Y, Okano HJ. Marmoset angiography just by percutaneous puncture of the caudal ventral artery. PLoS One. 2021;16(4):e0250576. Epub 2021/04/29. doi: 10.1371/journal.pone.0250576. PubMed PMID: 33909672; PubMed Central PMCID: PMC8081223.