

研究成果報告書

【申請者氏名】

神戸 裕介

【所属機関】

国立研究開発法人 国立循環器病研究センター
研究所 生体医工学部

【研究題目】

同一の生分解性と広範囲に異なる硬さを示すシルクフィブロインゲルを用いた心筋梗塞ゲル注入療法の治療メカニズム解明

【研究目的】

心疾患は、心臓移植を根治療法としてきたが、ドナー不足の問題がある。国内では細胞シート移植による再生医療の臨床例が報じられたが、そのリスク管理は容易ではない。近年、心筋梗塞部にハイドロゲルを注入することで、梗塞部の線維化に起因する心拡大、心機能低下の悪循環（「心筋リモデリング」と呼ばれる）が抑制されることが示されている（図1）。米国や欧州では、コンブ由来の天然高分子であるアルギネートから成るゲルを用いた治験が進められている。また、心筋梗塞ゲル注入療法に関する年間論文数もここ数年で倍増しており、天然および合成高分子由来の多種多様なゲル化材料が用いられている。しかし、ゲルの注入から心筋リモデリング抑制に至るメカニズムを探る研究はほとんど行われておらず、最適なゲルの物性は未解明である。

本療法の治療効果には、ゲルの硬さ（圧縮弾性率）と生分解性（分解速度）が影響するとされているが、どれくらいの硬さのゲルが、どれくらいの期間、心筋内に存在すべきか定かではない。これらの最適値の発見および心筋リモデリング抑制メカニズムの解明には、化学組成が同一であって、広範囲にかつ独立して硬さと生

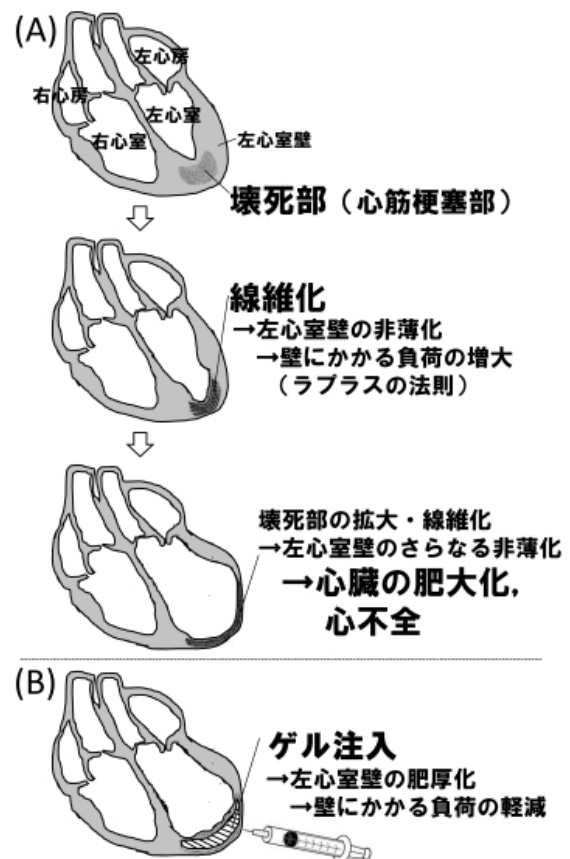


図1: 心機能の低下を伴う心筋リモデリング(A)とゲル注入による抑制(B)

分解性を変化させられるゲルが有用である。しかし、一般的に、ある材料パラメーターの変化は、別のパラメーターの変化も意図せず伴う。例えば、ゲルの硬さを強めるためにゲル化材料の濃度や架橋密度を上げると、生分解性も変化する。このため、心筋梗塞ゲル注入療法に対するゲルの一物性のみの効果を評価することは非常に困難である。

申請者らは、家蚕が産生するシルクフィブロイン（SF）タンパクから成るゲルの物性改変により、同一の硬さを示すも、生分解性が 1.5 倍異なる SF ゲルを作製し、心筋梗塞ゲル注入療法におけるゲルの生分解性の重要性を報告してきた（Y Kambe and T Yamaoka, Biomater Sci 2019;7:4153-4165）。また、同一の化学組成・生分解性を示すも、硬さが 3～15 倍も異なる SF ゲルのシリーズの開発に成功した。この特長的な性質を示す SF ゲルシリーズを活用し、本研究では、心筋梗塞ゲル注入療法におけるゲルの硬さの最適値の発見と治療メカニズムの一端を解明することを目的とした。

【研究内容及び成果】

SF 水溶液の調整：家蚕の繭（吉川商事より購入）を炭酸精練し、SF を得た。SF を 9 M 臭化リチウム水溶液に溶解後、逆浸透水中で透析（> 12 時間/回、透析外液交換 6 回）することで SF 水溶液を得た。透析後、透析チューブに入った SF 水溶液に風を当てて濃縮し、遠心分離（40,000×g、4℃、30 分）によって不溶成分を除いた。得られた SF 水溶液の一部を凍結乾燥することで、SF 水溶液の濃度を求めた。

SF ゲルの作製：申請者らがこれまでに確立してきた条件を基に、①SF 水溶液の濃度、②高温・高圧水蒸気（オートクレーブ；121℃、15 分）処理回数、③超音波ホモジナイザー（出力 750 W、周波数 20 kHz、増幅幅 21%；VCX-750、Sonics & Materials 製）による超音波照射時間、④SF 分子中のグリシン-アラニン繰返し領域由来ペプチド（NH₂-SGAASGAGAGAGAGAG-COOH、純度>90%、スクラム製）（以下 GA ペプチド）による修飾、の 4 条件を変化させ、同一の生分解性（1 mm 厚のゲルが分解されるのに約 35 週）を示し、異なる硬さ（13、53、170 kPa）を示す SF ゲル 3 種類を作製した（表 1）。

心筋梗塞モデルラットへの SF ゲル注入と心機能・左室径評価：ラット（Sprague Dawley、7 週齢、雄；日本 SLC 製）を 2～3%イソフルランで導入麻酔し、超音波心エコー装置（ProSound SSD-6500 SV；日立アロカメディカル製）を用いて処置前の心機能（左室短縮率（LVFS）、左室駆出率（LVEF））と左室径（左室拡張末期径（LVDd）、左室収縮末期径（LVDs））を計測した。16G サーフロー針の外筒を気管挿管し、ベンチレーター（70 bpm、4～5 mL/拍；夏目製作所製）を用いて呼吸および麻酔を維持した。開胸後、心臓の冠動脈（左前下行枝）

表 1：同一の生分解性と異なる硬さを示す SF ゲルシリーズの作製条件と硬さ

サンプル名	① SF 濃度	② オートクレーブ処理回数	③ 超音波照射時間	④ GA ペプチド修飾（濃度）	ゲルの硬さ
3.2%AC1US20+GA	3.2%	1	20 秒	+ (0.32%)	~13 kPa
4%AC2US20	4%	2	20 秒	—	~53 kPa
6%AC2US25	6%	2	25 秒	—	~170 kPa

を 7-0 ネスピレン糸（アルフレッサファーマ製）で結紮し、閉胸した。結紮後 1 週で、心機能と左室径を計測し、LVFS が 30%以下のラットを心筋梗塞モデルとして採用した。心筋梗塞モデルラットに気管挿管し、ベンチレーターを用いて呼吸および麻酔を維持しながら開胸した。30G 針付きシリンジを用いて、心筋梗塞部（左室壁の白色になった部分）に、3.2%AC1US20+GA、4%AC2US20 もしくは 6%AC2US25 ゲルを 100 μ L 注入した後、閉胸した。SF ゲル注入後 1、2、3、4、5、6 週に超音波心エコー装置を用いて、心機能と左室径を計測した。

SF ゲル注入心筋梗塞モデルラットの心臓の組織学的評価：ゲル注入後 6 週において、SF ゲル注入心筋梗塞モデルラットに気管挿管し、ベンチレーターを用いて呼吸および麻酔を維持しながら開胸した。心臓を回収し、生理食塩水で洗浄後、結紮部より 5~6 mm 心尖側の短軸断面を出し、写真撮影を行った。また、得られた心臓組織を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、ヘマトキシリン&エオシン（H&E）による組織染色（アプライドメディカルリサーチ社に委託）を行った。

SF ゲル上での心筋細胞の増殖評価：96 穴組織培養用プレート（旭硝子製）中に 3.2%AC1US20+GA、4%AC2US20 もしくは 6%AC2US25 ゲルを作製した（100 μ L/well）。ラット（Sprague Dawley、哺乳 3 日齢、雄；日本 SLC 製）を 2~3%イソフルランで導入麻酔し、心臓を回収した。その後、キット（Neonatal Cardiomyocyte Isolation System、Washington 製）を用いて、回収した心臓から心筋細胞を単離した。得られた心筋細胞を 4×10^4 cells/well の密度で SF ゲル上に播種し、37°C、湿度 100%、5%CO₂ の雰囲気中で培養した。なお、培地には MEM α （10%牛胎児血清、1%抗生物質カクテル含有）を用い、1、2 日毎に交換した（100 μ L/well）。播種後 1、3、5、7 日に WST-1 試薬（Roche 製）を 10 μ L 加え、2 時間培養した後、上清 100 μ L 回収し、プレートリーダー（Varioskan、Thermo Fisher Scientific 製）を用いて 450 nm の吸光度を計測した。

SF ゲルを注入した心筋梗塞モデルラットの心機能・左室径：同一の化学組成と生分解性を示すも、硬さが異なる（13、53、170 kPa）SF ゲル（3.2%AC1US20+GA、4%AC2US20、6%AC2US25）を注入した心筋梗塞モデルラットの心機能と左室径の経時変化を図 3 に示す。いずれの群も、冠動脈結紮によって心機能、左室径がそれぞれ大きく低下、増大した（-1 週→0 週）。一方、SF ゲル注入により、注入後 1 週では心機能が改善する傾向が認められた。特に、3.2%AC1US20+GA、6%AC2US25 群では、改善傾向が顕著であり、LVDs も減少した。しかしながら、2 週では、心機能は低下し、ゲル注入前（0 週）と同程度になった。その後、心機能はほぼ一定となり、心機能の悪化は認められなかった。一方、左室径は、2 週以降、徐々に増大した。注入後 6 週の心機能、左室径ともに、群間における顕著な差は認められなかった。これらの結果より、心筋梗塞ゲル注入療法において、ゲルの硬さは治療効果の発揮に重要な因子ではないことが示唆された。

SF ゲルを注入した心筋梗塞モデルラットの心臓の組織染色：3.2%AC1US20+GA、4%AC2US20、6%AC2US25 ゲル注入後 6 週における心筋梗塞モデルラットの心臓短軸断面像、また、その H&E 染色像をそれぞれ図 4、5 に示す。いずれの群の左室壁も白色であり、H&E 染色像から線維化していることが分かった。3.2%AC1US20+GA 群に比べ、4%AC2US2、

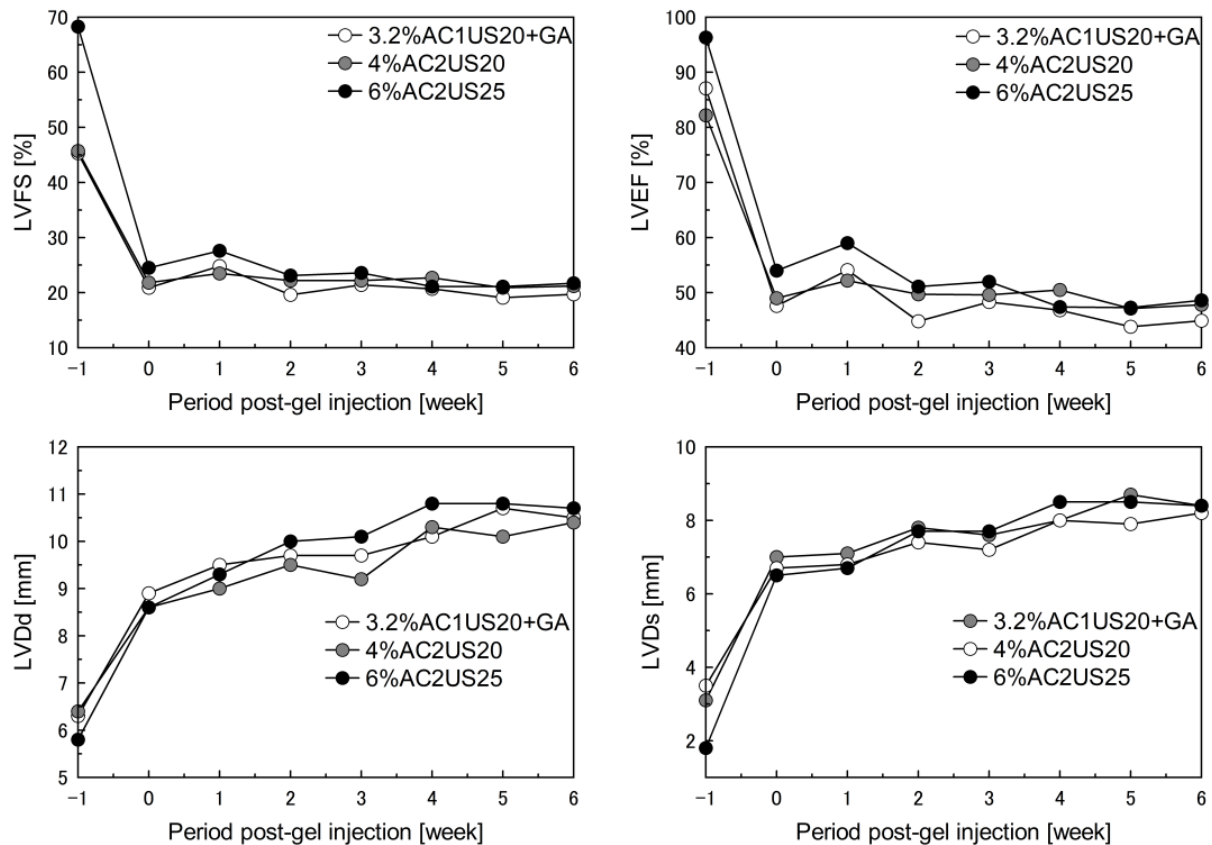


図 3 : SF ゲル注入心筋梗塞モデルラットの心機能 (LVFS、LVEF) と左室径 (LVDd、LVDs) の経時変化

6%AC2US25 両群の左室壁は厚い傾向が認められた。すなわち、53 kPa 以上の硬さを示すゲルの注入により、左室壁が肥厚することが分かった。心筋梗塞ゲル注入療法の治療メカニズムは、ラプラスの法則に基づき、ゲル注入により左室壁の肥厚化し、左室内腔面に負荷されるせん断応力が軽減されることによるとも言われてきた (ST Wall, et al., Circulation 2006;114:2627-2635)。一方で、それとは矛盾した、すなわち、左室壁の肥厚化は無関係であるとの知見も得られてきた (AA Rane, et al., PLoS One 2011;6:e21571)。本研究により、SF ゲル注入による心筋梗塞後の心機能悪化の抑制効果は、ラプラスの法則に依らないことが示唆された。

SF ゲル上での心筋細胞の増殖 : 3.2%AC1US20+GA、4%AC2US20、6%AC2US25 ゲル上で培養した心筋細胞の増殖評価結果を図 6 に示す。3.2%AC1US20+GA 群に比べ、4%AC2US20、6%AC2US25 両群は、高い細胞増殖性を示したことから、53 kPa 以上の硬さを示すゲル上では細胞が増殖し易いことが分かった。細胞増殖性の結果は、左室壁厚のそれ (図 5) と関連したが、ゲル注入による心筋梗塞後の心機能悪化の抑制効果とは、明らかな関係性は認められなかった。

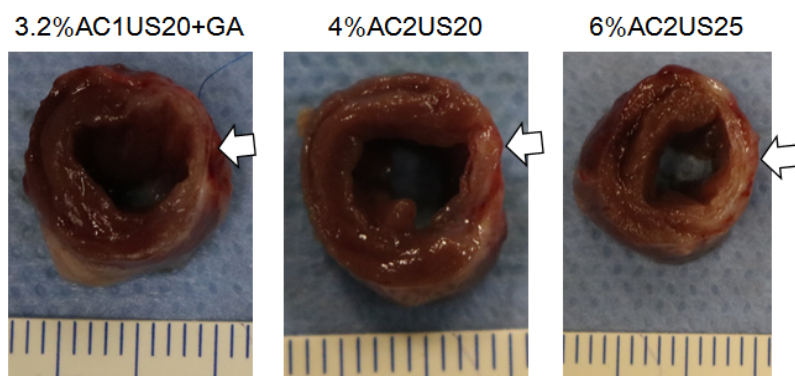


図 4 : SF ゲル注入後 6 週での心筋梗塞モデルラットの心臓の短軸断面。矢印は左室壁を示す

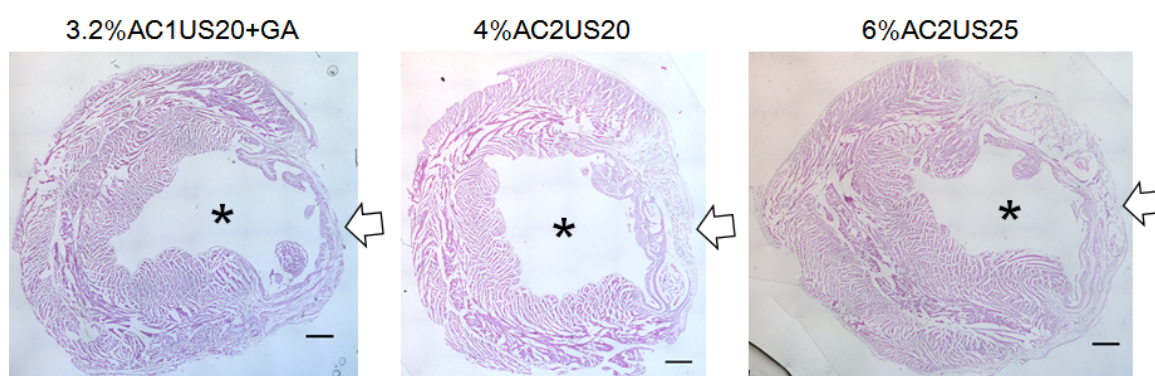


図 5:SF ゲル注入後 6 週での心筋梗塞モデルラットの心臓の短軸断面の H&E 染色像。矢印、アスタリスクはそれぞれ左室壁、左室内腔を示す。スケールバー：1 mm

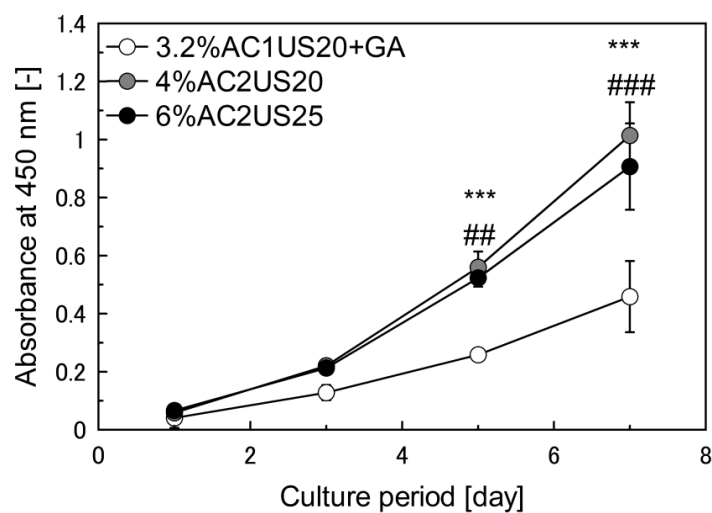


図 6 : SF ゲル上での心筋細胞の増殖性。*** : $p < 0.001$ (3.2%AC1US20+GA vs. 4%AC2US20) ,## : $p < 0.01$,### : $p < 0.001$ (3.2%AC1US20+GA vs. 6%AC2US25)

【今後の課題】

本研究により、SF ゲル中による心筋梗塞治療においては、SF ゲルの硬さが治療効果に及ぼす影響は少ないことが示唆された。SF 材料は、コラーゲンをはじめとする他の天然由来材料に比べて遅い生分解性を示すも (AE Thurber, et al., *Biomaterials* 2015;71:145-157)、慢性炎症や抗体産生は引き起こさないことが知られている (GH Altman, et al., *Biomaterials* 2003;24:401-416, Y Kambe, et al., *J Mater Chem B* 2017;5:7557-7571)。SF ゲルが惹起する炎症反応が生体組織再生の鍵となると考えられるため、今後はこれに着目した研究を推進したい。

末筆ではございますが、一般財団法人 大日本蚕糸会様からの貞明皇后研究助成によるご支援に深く感謝申し上げます。

【発表論文等】

該当無し。