

第5回 DDS 再生医療研究会 プログラム

日時 2015年11月28日(土) 開場 9:00 開会 9:30

会場 ガクトホール パシフィックマークス西梅田 14F
〒530-0001 大阪市北区梅田 2-6-20
TEL : 06-6346-0569

会長 磯貝 典孝(近畿大学医学部 形成外科学講座 主任教授)

事務局 近畿大学医学部形成外科学講座

事務局長 諸富 公昭

〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2

電話 : 072(366)0221 内線 3227 FAX:072(367)7517

メールアドレス : morotomi@med.kindai.ac.jp

第5回 DDS 再生医療研究会 役員名簿

(50音順 敬称略 2015年11月1日現在)

	氏名	所属
会長	磯貝 典孝	近畿大学形成外科
代表世話人	田畑 泰彦	京都大学再生医科学研究所
世話人	秋山 治彦	岐阜大学整形外科
	朝比奈 泉	長崎大学口腔外科
	和泉 雄一	東京医科歯科大学歯周病科
	磯貝 典孝	近畿大学形成外科
	伊藤 壽一	京都大学耳鼻咽喉科
	内田 英二	日本医科大学消化器外科
	金指 幹元	鶴見大学歯周病科
	貴志 和生	慶應義塾大学形成外科
	黒田 良祐	神戸大学整形外科
	斎木 佳克	東北大学心臓血管外科
	斎藤 繁	群馬大学麻酔神経科学分野
	鈴木 茂彦	京都大学形成外科
	清水 章	京都大学探索医療センター
	高井 信朗	日本医科大学整形外科
	高木 元	日本医科大学循環器内科
	土方 重樹	科研製薬学術部
	中村 雅也	慶應義塾大学整形外科
	羽藤 直人	愛媛大学耳鼻咽喉科
	松野 智宣	日本歯科大学口腔外科
	丸井 晃	京都大学心臓血管外科
水野 博司	順天堂大学形成外科	
宮本 正章	日本医科大学循環器内科	
森本 尚樹	関西医科大学形成外科	
山本 雅哉	京都大学再生医科学研究所	
吉増 達也	和歌山県立医科大学第一外科	

ご挨拶

この度、第5回DDS再生医療研究会を2015年11月28日(土)、パシフィックマックス西梅田 ガクトホールにて開催する運びとなりました。本研究会が有意義な情報・意見交換の場となることを念願しながら企画をさせて頂きました。ぜひ多数の皆様のご参加をお願い申し上げます。

メインテーマは、本研究会が“DDS”を探求する場のみならず、最終目標として再生医療の臨床応用を目指す視点から、“基礎研究と臨床応用を結ぶDDS”とさせて頂きました。例年通り、DDSに関する基礎(4題)および臨床研究(5題)に加え、特別講演として近畿大学薬学総合研究所 森山先生(脂肪由来幹細胞)、岡山大学大学院自然科学研究科 小西先生(人工骨)、同志社大学生命医科学研究科 萩原先生(管状臓器の再生誘導)、近畿大学生物理工学部 森本先生(コラーゲン・マテリアル)をお招きしてお得意の分野のご講演をお願いいたしました。再生誘導の3大因子である細胞、サイトカイン、足場のそれぞれの観点から再生医療を俯瞰し、組織再生誘導に関する詳細な研究成果と最新の知見をご紹介します。

本研究会の節目となる第5回を記念し、今回は、形成外科領域における各種組織の再生誘導の試み(5題)を企画させて頂き、形成外科領域における各種組織の再生誘導に関する取り組みをご紹介します企画といたしました。

どのセッションも各領域の第一線でご活躍されている先生方がご登壇されます。皆様の活発な議論を通じて、本研究会が再生医療に関する理解を深め、同時に“基礎研究と臨床応用を結ぶDDS”の研究成果の結実に寄与できる場となりえましたら幸甚です。

11月28日には、大阪で開催される第5回DDS再生医療研究会に、ひとりでも多くの方にご参加いただき、参加者の皆様の連携強化の場としてもご活用いただけますと幸いです。

皆様の研究会へのご参加を教室員一同心よりお待ちしております。重ねまして、宜しく願い申し上げます。

第5回 DDS 再生医療研究会
会長 磯貝 典孝

会場のご案内



【ホテル阪神】

〒553-0003 大阪市福島区福島5-6-16
TEL 06-6344-1661

11/27(金) 世話人会 18:00～
情報交換会 19:00～

【ガクトホール】

〒550-0001 大阪市北区梅田2-6-20
パシフィックマークス西梅田14F TEL 06-6346-0569

11/28(土) 研究会 9:30～

参加者へのご案内

◆演者の方へ

1. 一般演題の発表時間は10分、討論5分です。
2. 口演予定時間の30分以上前までに演者受付にお越しください。
3. 発表形式は、Windows版Microsoft Power Point 2010による口演のみです。
 - ◇ PCプロジェクターは1台です。
 - ◇ Windows版Microsoft Power Point 2010で再生可能なファイルをUSBメモリまたはCD-Rでご持参ください。
 - ◇ フォントはWindows 7に標準添付のものを用いてください。
 - ◇ ご自身のPCをご持参していただく事も可能です。
 - ◇ ご不明の点は、予め上記事務局へお問い合わせください。

◆来場される方へ

受付で医師、歯科医師、企業の方は会費5,000円を徴収させていただきます。
(研修医、学生などの方は会費3,000円)

日程表

11月27日(金)	世話人会	18:00 ~ 19:00	ホテル阪神12F
	情報交換会	19:00 ~ 21:00	サロンパール
11月28日(土)	研究会 9:30~16:30 パシフィクマル西梅田14F ガクトホール		
9:30	開会挨拶		世話人代表 田畑 泰彦
9:35	セッションⅠ基礎研究(1~4)		座長金指 幹元
10:35	休憩		
10:40	セッションⅡ臨床研究(5~9)		座長黒田 良祐
11:55	休憩		
12:05	特別講演Ⅰ(ランチョン) 「脂肪由来幹細胞の特徴と脂肪細胞移植における基礎研究からの留意点」 近畿大学薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 准教授 森山 博由		司 会水野博司
12:50	休憩		
12:55	特別講演Ⅱ 「生体吸収置換型ペースト状人工骨の開発」 岡山大学大学院 自然科学研究科 生命医用工学講座 助教 小西 敏功		司 会松野智宣
13:40	特別講演Ⅲ 「大動物を用いた管状臓器再生の試み」 同志社大学生命医科学研究科 医生命システム専攻 再生医科学研究室 教授 萩原 明於		司 会宮本正章
14:25	休憩		
14:30	セッションⅢ 形成外科領域における各種組織の再生誘導(10~14)		座長田中 嘉雄
15:45	特別講演Ⅳ 「潜在的な物性を引き出したコラーゲン・マテリアルの創製」 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 教授 森本 康一		司 会土方重樹
16:30	閉会挨拶		会 長磯貝 典孝

一般演題発表スケジュール

時間	演題番号		演題	演者
9:35	セッションI 基礎研究	座長 金指幹元	1 歯周組織再生薬KCB-1D 開発の道のり	科研製薬 土方重樹
9:50			2 チタン表面のH ₂ O ₂ 水熱酸化処理はFGF-2を担持してBone Bioactivityを高める	日本歯科大学歯科口腔外科 松野智宣
10:05			3 再生医療用ゼラチンについて	新田ゼラチン ライフサイエンス室 井田昌孝
10:20			4 ゼラチンハイドロゲル微粒子添加は心臓組織シート移植の多層化と長期生着を可能とする	京都大学 心臓血管外科 幾野 毅
10:35	休憩			
10:40	セッションII 臨床研究	座長 黒田 良祐	5 塩基性線維芽細胞増殖因子含有ゼラチンハイドロゲルシートによる心筋再生治療	京都大学 心臓血管外科 西尾博臣
10:55			6 徐放化多血小板血漿による再生治療適正化の試み	日本医科大学 循環器内科 高木 元
11:10			7 シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲルによる膝半月板修復の可能性	神戸大学 整形外科 黒田良祐
11:25			8 特発性大腿骨頭壊死症に対するrhFGF-2ハイドロゲルを用いた低侵襲再生医療	京都大学 整形外科 黒田 隆
11:40			9 外傷性顔面神経麻痺に対する徐放化栄養因子を用いた顔面神経減荷手術の検討	愛媛大学 耳鼻咽喉科・頭頸部科 山田啓之
11:55	休憩			
12:05	特別講演I (ランチョン)			
12:50	休憩			
12:55	特別講演II			
13:40	特別講演III			
14:25	休憩			
14:30	セッションIII 形成外科領域における 各種組織の再生誘導	座長 田中 嘉雄	10 コラーゲン/ゼラチンスポンジのHGF単独、bFGF同時徐放能と創傷治癒促進効果の検討	関西医科大学 形成外科 萩野秀一
14:45			11 徐放化PRPとβ-TCPとの複合体を用いたラット頭蓋骨新生促進効果	順天堂大学 形成外科・美容外科 清水 梓
15:00			12 微細加工装置により作製したマイクロ軟骨を細胞供給源とする新規軟骨再生誘導法の開発	近畿大学 形成外科 西脇 仁
15:15			13 臨床応用をめざしたin vivo Tissue engineering Vascularized Fat flapの作製	香川大学 形成外科 田中嘉雄
15:30			14 ゼラチンハイドロゲル神経チューブを足場に移植した脂肪由来幹細胞の神経再生効果と運命追跡	京都府立医科大学 形成外科 素輪善弘
15:45	特別講演IV			

特別講演 I

脂肪由来幹細胞の特徴と脂肪細胞移植における基礎研究からの留意点

森山博由

近畿大学薬学総合研究所先端バイオ医薬研究室

細胞再生医療において、分化誘導系の確立と同等に原材料となる初期細胞（ヒト幹細胞群やダイレクトリプログラミングに適応する細胞源など）の細胞資材ラインナップの充足は必須の命題となっている。現在、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を中心とした Pluripotency をもつ幹細胞がその主流を担い、この分野を牽引している。一方、特定の終末分化細胞を標的としたとき、それらの用途に応じて対象となるヒト幹細胞や分化誘導法は多様化して捉えることができる。ヒト生体内に存在し、複数の分化方向性能力 (Multipotency) を有する体性 (組織) 幹細胞は、その選択枝のひとつとしてのクラスターを形成していると言える。このような目的志向するヒト生体内組織は多岐に及ぶが、我々の研究室が創出した脂肪組織に存在するヒト脂肪組織由来新規間葉系幹細胞群、およびその創製技術も細胞再生医療の一役を担っている。今回、この幹細胞のもつサイトカイン産生や増殖・分化能の性状、およびある種の Multipotency を生み出す動力源となる Notch-Hes シグナル系や糖代謝系のメカニズムを解説させていただく。そして、この細胞を用いた脂肪細胞分化系のアプリケーションにおける基礎研究から垣間見られる留意点等を紹介させていただきたい。本研究が、再生医療ならびに創薬研究等の臨床の現場への橋渡し研究として、より広く貢献できることを望んでいる。

略歴： もりやま ひろゆき

- 近畿大学薬学総合研究所 先端バイオ医薬研究室 准教授 (PI) 博士 (理学)
- 1972 年 10 月生まれ。鹿児島県出身
- 1998 年京都大学大学院人間環境学研究所人間環境学専攻博士前期課程修了。2001 年まで、宝酒造株式会社(現タカラバイオ)中央研究所遺伝子治療部門。退社後、2006 年に京都大学大学院理学研究科生物物理学系生物科学専攻博士後期課程を修了。2006 年京都大学大学院生命科学研究所高次遺伝情報学分野研究員。2007-2010 年 Harvard Medical School / Massachusetts General Hospital / Cutaneous Biology Research Center, Postdoctoral Fellow。2010 年より現職
- 【受賞歴】 2010 年 : Annual Research Award in Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School).

特別講演Ⅱ

生体吸収置換型ペースト状人工骨の開発

小西敏功¹、木南啓司²、有村英俊²、相澤守³

岡山大学大学院自然科学研究科¹

グンゼ株式会社 QOL 研究所²

明治大学理工学部応用化学科³

バイオセラミックスは整形外科領域で骨補填材として臨床応用されている。そのなかでもリン酸カルシウム系ペースト状人工骨は、術中に骨欠損形状に左右されずに任意形状で使用できるため注目されている。我々は、これまでに生体関連物質であるイノシトールリン酸 (IP6) のキレート能でリン酸カルシウム粒子が硬化する新規なペースト状人工骨の創製に成功している。また、この基盤技術をもとに、ゼラチン粒子を用いた「生体吸収置換型有機/無機ハイブリッド型ペースト状人工骨」を創製し、その生体吸収置換能を明らかにしている。本講演では、「キレート硬化型ペースト状人工骨」とともに、最近の取り組みとして「有機/無機ハイブリッド型ペースト状人工骨」について紹介する。

略歴： こにし としいき

- 2004-2008 明治大学 理工学部 応用科学科 学士取得
- 2008-2010 明治大学大学院 理工学研究科 応用科学専攻 博士前期課程修了 修士(工学)取得
- 2012-2013 明治大学大学院 理工学研究科 応用科学専攻 博士後期課程修了 博士(工学)取得
- 2013-現在 岡山大学 大学院自然科学研究科 助教

【賞罰】

- 2011.12月 ABC Award 2011
@ 11th Asian BioCeramics Symposium, Japan
- 2013.6月 RacquelLegGeros Young Scientist Award
@6th International Symposium on Apatite and Correlative Biomaterials 2013 (ISACB), France
- 2014.4月 山陽放送学術文化財団 第51回(平成25年度)学術奨励賞(工学分野)
- 2015.7月 岡山工学振興会 科学技術賞

特別講演Ⅲ

大動物を用いた管状臓器再生の試み

萩原明於

同志社大学・生命医科学部

イヌ胸部食道の再生：PGA不織布+羊膜の上にイヌ口腔粘膜由来の扁平上皮細胞と線維芽細胞を播種して *In Vitro* で培養後、更にイヌ胃平滑筋細胞塊を種播し、これを筒状に形成し人工食道とした。この人工食道をイヌ腹腔内に2週間程置き、播種細胞が十分増殖し周囲から栄養血管が侵入した状態として、これを栄養血管を付けたまま胸部食道に間置・移植した。1年以上観察し、組織学的・機能的形態的に人工食道が再生された。

イヌ大動脈の再生：再生足場の外筒は、数百 μm と比較的大孔径を持つLA/CLとPLAの多層の布を筒状に形成して用いた。内筒は、コラーゲン+LA/CLを成分としESD法で作成した数 μm と小孔径を持つ不織布を、内径6mm～8mmの管状に形成して用いた。上記の内・外筒から成る人工動脈を、イヌ大動脈に間置・吻合し、1年以上、機能的・組織学的に観察し、大動脈類似の人工動脈が再生された。

略歴： はぎわら あけお

- 1948年 奈良県で生まれる
- 1974年 京都府立医大 卒
- 1984年 医学博士 (秋田大学)
- 1985年 舞鶴赤十字病院外科 副部長
- 2003年 京都府立医科大学外科 助教授
- 2008年 同志社大学生命医科学部 再生医学研究室 教授
- 日本再生医療学会評議員、日本消化器病学会指導医、日本外科学会指導医、日本消化器外科学会指導医、など

特別講演IV

潜在的な物性を引き出したコラーゲン・マテリアルの創製

森本康一、國井 沙織

近畿大学生物理工学部遺伝子工学科

コラーゲンとゼラチンは、バイオマテリアルとして盤石な地位を築いている。例えば、ゼラチンは DDS の基材、ペプシンでテロペプチド領域を切断したアテロコラーゲンは止血剤や骨充填材などの材料として医療現場で活用されている。その他にも、細胞培養では細胞が接着する足場として日常的に使われる。これまで、細胞とコラーゲンとの接着は必然なことで理解されてきた。しかし最近、われわれは細胞が接着しにくくなるコラーゲンを作り出すことに成功し、それを **Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCOL)** と名付けた。LASCOL は 3 本鎖らせん構造を有し、自己会合して線維形成するコラーゲンの特徴を残しているが、細胞への応答性は激変している。LASCOL で培養した細胞は移動しながら集まり、次第に 3 次元凝集体を形成する。本発表では、コラーゲンの潜在的な物性変化として LASCOL を紹介する。

略歴： もりもと こういち

- 北海道大学理学研究科高分子学専攻 博士前期課程修了
- 東ソー株式会社 生物工学研究所研究員 この間に京都大学博士（農学）を取得
- 近畿大学生物理工学部 講師
- 同学部 准教授
- 同学部 教授
- 日本生化学会 評議員
- 日本農芸化学会 参与

1. 歯周組織再生薬 KCB-1D 開発の道のり

土方重樹

科研製薬株式会社

歯周病（歯周炎）は、歯と歯肉の境界部に蓄積された細菌の塊（プラーク）により、歯周組織に慢性炎症を生じる病態である。初期においては歯肉の腫脹・出血を主訴とし、進行すると歯槽骨をはじめとする歯周組織の破壊により歯牙の欠落に至る。また歯周病は、糖尿病をはじめとする様々な内科疾患との関連が示唆されており、近年その医歯学分野での研究が進んでいる。

bFGF（FGF-2）は広く間葉系細胞に作用し、その増殖・遊走に関与する。また強力な血管新生作用を有することから、再生医療に重要な因子のひとつとして位置づけられている。科研製薬はこれら bFGF の薬理作用が歯周組織再生に有効と考え、1990 年代半ばより非臨床試験を開始した。イヌ・サルを用いた検討より、bFGF は歯槽骨のみならず、歯根膜やセメント質の再生作用を持つことが明らかとなった。

bFGF の歯周炎への応用を企図し、大阪大学歯学部村上伸也教授を中心とし 2001 年より臨床試験を開始した。探索的試験、ついで用量設定試験の結果、bFGF は歯肉剥離掻爬術（フラップ手術）時に単回塗布することにより、フラップ手術単独に比べ欠損歯槽骨を有意に再生することが明らかとなった。PMDA と慎重な協議を行い、プラセボを対照とした検証的試験、さらに歯周組織再生を促す医療機器として承認されているエムドゲイン®ゲルを対照とした検証的試験を行った。

KCB-1D は本製剤のコードネームであり、上顎に投与しても十分付着力を得るよう設計された製剤である。不安定な bFGF 粉末を、粘性の高い溶解液と用時混和できるように、キット化されている。科研製薬は現在、KCB-1D の承認申請のための準備を行っている。

本発表に際し、大阪大学歯学部村上伸也教授をはじめ、非臨床試験・臨床試験にご参画頂いた先生方に深謝致します。また本発表に開示すべき利益相反はありません。

2.チタン表面の H₂O₂ 水熱酸化処理は FGF-2 を担持して Bone Bioactivity を高める

松野智宣¹、米山勇哉²、三木貴仁¹、浅野一成¹、又賀 泉¹

日本歯科大学生命歯学部口腔外科学講座¹

東京医科大学医学部口腔外科学分野²

【目的】現在、整形外科や口腔外科領域で使用される骨固定用のスクリューの多くはチタン製で、その表面はほとんどが機械研磨面となっている。また、チタンは加工直後から表面に酸化膜が形成され、大気中の炭素などが経時的に付着して、細胞の接着や増殖・分化に影響を及ぼす Biological aging が生じると報告されている。特に近年、骨代謝の低下した高齢者が増加していく中で、このような影響がスクリューの緩みや感染などの一因となって、治癒を遅延させていくことが考えられる。

そこで我々は、安全かつ簡便にチタン表面の親水性を高めて、タンパク吸着や細胞の接着および増殖能を促進させるナノレベルの微細な酸化チタン膜を形成できる H₂O₂ 水熱酸化法を開発した。そして、さらにこの酸化チタン層に FGF-2 を担持させて、Bone Bioactivity をより高めるチタン表面の機能化について in vitro と in vivo で検証したので報告する。

【方法】in vitro 研究では、6-4 チタンディスクを 3% H₂O₂ に浸漬したまま、通常のオートクレーブ滅菌を行い (H₂O₂ 水熱酸化処理)、乾燥後、0.1 μ g/mL の FGF-2 をチタンディスク表面に滴下した。この表面に対する FGF-2 の接触角測定、チトクローム C 吸着試験および MT3T3-E1 を用いた細胞培養実験を行った。また、in vivo 研究では 6-4 チタンミニスクリューを同様に処理し、ラット大腿骨に 4 週間埋植した。

【結果】H₂O₂ 水熱酸化処理をすることでチタン表面の FGF-2 の親水性が高まった。その結果、チタンディスク表面のタンパク吸着が向上し、伸展した細胞が密に接着して、未処理群に比べて増殖・分化が有意に促進した。また、ミニスクリュー周囲の骨接触率や骨面積も未処理群に比べて有意に増加した。

【結論】チタン表面への H₂O₂ 水熱酸化処理は安全かつ簡便で、FGF-2 を担持して骨形成に関わる Bioactivity を高めて、ミニスクリュー周囲に早期の骨形成を促進させることができた。これにより、骨代謝が低下している高齢者の骨折治療リスクを軽減させることができると示唆された。

*本演題に関して、発表者の開示すべき利益相反状態はない。

3.再生医療用ゼラチンについて

井田昌孝、平岡陽介

新田ゼラチン株式会社 経営企画部ライフサイエンス室

新田ゼラチン株式会社は、創業 97 年を迎えたゼラチン、コラーゲン、コラーゲンペプチドのメーカーです。これらの天然素材は、食品、写真、カプセル、接着剤、化粧品、細胞培養基材などの用途に使用されております。近年、再生医療分野（細胞移植およびティッシュ・エンジニアリング）において、ゼラチン、コラーゲンが用いられています。例えば、生体親和性、分解消失期間の制御、シートや粒子などへの加工性の点から、薬剤徐放の担体としてゼラチンが用いられてきました。その臨床研究数の増加に伴い、当社では再生医療用の低エンドトキシンゼラチン(**beMatrix[®] gelatin**)を開発した **beMatrix[®] gelatin** の特性、取り組み、応用例をご紹介します。

4.ゼラチンハイドロゲル微粒子添加は心臓組織シート移植の多層化と長期生着を可能とする

幾野 毅^{1,2}、松尾武彦^{1,2}、升本英利^{1,2}、南方謙二¹、山崎和裕¹、阪口仁寿¹、上原京勲¹、中田朋宏¹、池田義¹、田畑泰彦³、山下 潤²

京都大学心臓血管外科¹ 京都大学 iPS 細胞研究所増殖分化機構研究部門²

京都大学再生医科学研究所 生体材料学分野³

【背景】iPS 細胞を用いた再生医療の臨床応用が始まり、心臓領域においても期待が高まっている。我々はすでにラット亜急性期心筋梗塞モデルにおいてマウス ES 細胞由来、及び、ヒト iPS 細胞由来心臓組織シートが心機能を改善させる効果があることを示した。検討ではシートとして移植された心筋は徐々に減少するが、細胞から放出される細胞伝達物質が血管新生を引き起こし間接的に作用していることが分かった。心筋が壊死しすでに癒痕線維化している慢性期心筋梗塞などに対しては、心筋を補充することなくして機能改善は見込めないと考えられる。このため、移植細胞数の増加、並びに、生着効率の向上は急務と考えられた。

【目的】ゼラチンハイドロゲル微粒子(GHM)をシート間に挟むことで、移植後の生着を妨げる低酸素、低栄養状態の改善を試みた。

【方法】GHM を間にはさみ 5 層積層化したマウス ES 細胞由来心臓組織シート(GHM 群)、もしくは、GHM を使用せずに単純に 5 層積層化したシート(Control 群)を作成した。F344/NJcl-*rmu/rmu* ラットを用いて、亜急性期心筋梗塞モデルを作成、上記 2 種類のシートを移植し、グラフトの状態や効果を比較した。

【結果】*in vitro* にて 7 日間の培養後、GHM 群は Control 群に比較し厚さは倍に保たれ、シート断面積は 13 倍となった。Apoptosis を示す TUNEL や、低酸素を評価する HIF は GHM 群で有意に少なかった。*In vivo* においても、移植後一か月後に残存した移植片の面積は有意に GHM 群で大きかった(3.10 ± 0.47 , vs. $0.67 \pm 0.15 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$)。移植後 3 か月後に生着した細胞数は control の約 20 倍に達した。移植 1 か月後にグラフト内の血流と、sarcomere 構造を確認した。GHM 群は Control 群に比して、移植後 1 週目より有意に心機能(%FS)の改善を認め、無収縮領域は縮小した。その効果は 12 週を超えても持続した。

【結論】

GHM を心臓組織シート間に挟むことで、移植片の環境を改善でき細胞生着を大幅に改善した。結果、ラット亜急性期心筋梗塞モデルの心機能をさらに改善させ、梗塞の範囲を減少させた。

5.塩基性線維芽細胞増殖因子含有ゼラチンハイドロゲルシートによる 心筋再生治療

西尾博臣¹、南方謙二¹、熊谷基之²、山本雅哉³、大村友博⁴、坂本和久¹、中津太郎¹、
中田朋宏¹、上原京勲¹、阪口仁寿¹、山崎和裕¹、池田義¹、松原和夫⁴、田畑泰彦³、
坂田隆造⁵

京都大学心臓血管外科¹、浜松労災病院心臓血管外科²

京都大学再生医学研究所³、京都大学医学部附属病院薬剤部⁴

神戸市立医療センター中央市民病院⁵

虚血性心疾患の治療法には、薬物療法や、経皮的冠動脈形成術・冠動脈バイパス術などの血行再建療法があるが、これらの治療法に反応せず、重症心筋虚血から心筋梗塞、虚血性心筋症へと病状が進行していく患者も数多く存在する。このため重症虚血性心疾患に対する新しい治療法の開発が期待されている。近年、心筋再生治療が注目されており、遺伝子治療や細胞移植治療が試みられているが、様々な課題があるために確立された治療法になり得ていない。一方、我々は以前より心筋再生治療としてタンパク治療による血管新生療法に取り組んできた。すなわち、より安全・シンプルかつ効果的な方策として、ゼラチンハイドロゲル(GH)を生体材料ドラッグデリバリーシステムとすることで塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)徐放化システムを構築し、血管新生効果を示してきた。

慢性心筋梗塞大動物モデルを用いた bFGF 含有 GH シートによる血管新生効果の検討では、ビーグル犬にて心筋梗塞を作成し、4週後に心筋梗塞部を覆うように 200 μ g bFGF 含有 GH シートを貼付し、対照群には生食含有 GH シートを貼付した。この治療後の血液、心エコー、組織学的評価を比較したところ、左室内径短縮率は治療 6 週間後には bFGF 群で有意に改善し、capillary density の評価においても心筋梗塞境界部、及び心筋梗塞部ともに bFGF 群で有意に多く認められた。一方、治療に関連した死亡及び有害事象は認めず、また、血中 bFGF 濃度は全例検出限界以下だった。

これらの結果は bFGF 徐放化システムが血管新生を促進し、心機能を改善させる可能性があることを示唆しており、今回、我々はこれをヒトに応用した臨床試験を開始する。その目的は、冠動脈バイパス術を必要とする重症虚血性心疾患患者を対象として bFGF 含有 GH シートの安全性を評価し、有効性を探索的に調べることである。その概要を報告する。

6.徐放化多血小板血漿による再生治療適正化の試み

高木 元、宮本正章、太良修平、久保田芳明、桐木園子、手塚晶人、高木郁代、清水 渉
日本医科大学循環器内科

2002年に開始した自己骨髄細胞移植による血管新生療法を発展させた再生治療の方法として、徐放化多血小板血漿による難治性潰瘍への治療研究を考案し、基礎研究によりその有効性を確認後、臨床研究を開始した。

認定再生医療委員会でのプレゼンテーション時の質疑応答を参考に、実際のプロトコール作成に際し注意すべき点を検討した。特に血液分離装置 (Magellan®) の影響、活性剤として使用した塩化カルシウムの増殖因子への影響。濃縮後の PRP とゼラチンとの結合度合いと注射器での投与の関係、またゼラチンの安全性に関する内容が検討課題であった。また、活性化の有無による血中の各種成長因子濃度の違いを考察した。これによる数例の臨床効果を報告する。

各種検討課題はあるものの、本研究は幹細胞 (培養を含む) 操作が不要であり、末梢血濃縮のみで作成できる簡便性、自身の生体材料による副作用軽減、さらに徐放化による投与回数軽減が特徴であり、低侵襲で再投与も可能な臨床応用に適した安全かつ有効な再生治療と考える。

7.シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲルによる膝半月板修復の可能性

黒田良祐¹、張 樹蓉¹、松下雄彦¹、長井寛斗¹、田中聡一¹、
田畑泰彦²

神戸大学大学院整形外科¹

京都大学再生医科学研究所生体材料学分野²

【目的】 シンバスタチンは高脂血症治療薬として広く用いられているが、近年、様々な薬理効果が報告されている。過去に我々はゼラチンハイドロゲルを用いたシンバスタチンの局所徐放による骨や靭帯の再生促進効果について報告を行ってきた。膝半月板は膝関節の安定性、潤滑性において重要な役割を担う線維性軟骨組織である。無血管組織であり自己治癒能力に乏しく一旦損傷すると自然治癒することはない。本研究の目的はシンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲルによる膝半月板修復の可能性調べることである。

【方法】 まず、日本白色家兎の内側半月板に直径 1.5mm の円柱形半月欠損部を作成し、欠損部にシンバスタチン含有ハイドロゲルを投与した群とシンバスタチン非含有のハイドロゲルのみを投与したコントロール群に分け、術後 4、8、12 週で半月板を採取して組織学的評価を行った。次に、内反型変形性膝関節症患者より手術時に外側半月板を採取し、inner 領域と outer 領域に半割し、各領域より細胞を単離した。培養液中にシンバスタチンを含む群と含まない非投与群に分けて 7 日間 3 次元培養した後 RNA を抽出して遺伝子発現変化を調べた。さらに、ヒト外側半月板に 1cm の縦断裂を作成し、シンバスタチン投与群、非投与群に分けて 2 週間器官培養を行い、組織学的評価を行った。

【結果】 家兎半月板損傷モデルにおいて、シンバスタチン投与群はコントロール群に比して組織学的スコアが有意に高く、治癒促進傾向をみとめた。培養ヒト半月板細胞においてシンバスタチン投与群では、BMP-2、BMP-7mRNA の発現が非投与群に比べ有意に増加した。また、器官培養半月板において、投与群では非投与群に比べ半月板損傷部に新生組織の増生が認められた。

【結論及び察】 シンバスタチンの局所徐放は半月板損傷の治癒に対して有効である可能性が示唆された。

8.特発性大腿骨頭壊死症に対する rhFGF-2 ハイドロゲルを用いた 低侵襲再生医療

黒田隆¹、浅田隆太²、南角 学³、猪原登志子⁴、宗 和隆¹、後藤公志¹、田畑泰彦⁵、秋山治彦⁶、
松田秀一¹

京都大学整形外科¹、岐阜大学附属病院先進医療・臨床研究推進センター²、京都大学附属病院リハビリテーション部³、京都大学臨床研究総合センター⁴、京都大学再生医科学研究所生体材料学分野⁵、岐阜大学整形外科⁶

【目的】大腿骨頭壊死症は7~8割で骨頭が圧潰し歩行障害をきたす指定難病で30~40代に好発する。骨切り術など従来の関節温存手術は難度、侵襲とも大きく、若年者でも人工関節となる場合が多い。最も期待されているのは骨頭圧潰前の低侵襲再生医療であり、長年の研究ターゲットであった。rhFGF-2 ハイドロゲルを用いた探索的試験の結果を示す。

【方法】対象は骨頭圧潰前ステージ2までの患者10名で当院倫理委員会の承認を得て、2013年3月から臨床試験を開始した。観察期間12か月、主要エンドポイントは有害事象の発生、副次エンドポイントは骨頭圧潰阻止、病期の変化、臨床評価(疼痛VAS, HHS, UCLAスコア)、骨再生評価である。患者は男女5名ずつ、平均年齢39.8歳、背景因子はステロイド性8例、アルコール性2例であった。病期はステージ1が1例、ステージ2が9例(CTで3Aの1例含む)、病型はタイプBが2例、C1が1例、C2が7例であった。腰麻下、1cmの皮切で経皮的に800 μ g含浸rhFGF-2ハイドロゲルを埋入した。【結果】術前に算出した壊死体積率は27.4%であった。手術時間は平均18分、術翌日から歩行を許可した。問題となる有害事象はなく、術前CTでステージ3と考えられた1例を除いて、病期の進行を認めていない。臨床スコアは術前平均(疼痛VAS 21.2mm, UCLAスコア 5.5, HHS 81.0点)から術後2年平均(疼痛VAS 5.3mm, UCLAスコア 6.6, HHS 98.4点)へ有意に改善した。Xp, CTで壊死領域や骨頭の軟骨下骨部での骨再生を認めた。【考察】rhFGF-2ハイドロゲルを用いた治療は骨再生と骨頭圧潰を防ぐ積極的な早期低侵襲治療として期待できる。今年度よりAMEDでの多施設医師主導治験を予定している。

9.外傷性顔面神経麻痺に対する徐放化栄養因子を用いた顔面神経減荷手術の検討

山田啓之、羽藤直人、飴矢美里

愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科

【目的】外傷性顔面神経麻痺は Bell 麻痺、Hunt 症候群に次いで 3 番目に多い顔面神経麻痺の原因疾患である。その多くは頭部外傷から発症するため初診時には意識障害があること、また頭蓋内病変の治療が優先されることからしばしば麻痺の診断、治療が遅れ予後不良となることがある。今回、我々は外傷性顔面神経麻痺の高度麻痺に対して徐放化栄養因子（basic fibroblast growth factor 添加ゼラチンハイドロゲル）を用いた顔面神経減荷手術を行いその有効性について検討したので報告する。

【対象と方法】対象は当科を受診した外傷性顔面神経麻痺の中、表情筋スコアが 8 点以下（柳原法）、NET がスケールアウト、ENoG が 10%未満で徐放化栄養因子を用いた顔面神経減荷術を行った 6 例とした。

本検討では最終の表情筋スコアが 38 点以上に改善した症例の割合を著明改善率、32 点以上に改善した症例の割合を改善率とし検討した。

【結果】著明改善率は 50%（6 例中 3 例）、改善率は 100%（6 例中 6 例）であった。

【考察】外傷性顔面神経麻痺に対して徐放化栄養因子を用いた顔面神経減荷術を行い著明改善率 50%、改善率 100%と良好な結果を得た。本術式は外傷性顔面神経麻痺に対しても有効な治療法の可能性があり、今後、さらなる基礎的研究やエビデンスレベルの高い臨床研究を行う必要があると考えられた。

10. コラーゲン/ゼラチンスポンジの HGF 単独、bFGF 同時徐放能と創傷治癒促進効果の検討

荻野秀一¹、森本尚樹²、坂本道治¹、神野千鶴¹、坂元悠紀³、河合勝也¹、鈴木茂彦¹

京都大学医学部形成外科¹

関西医科大学形成外科²

ゲンゼ株式会社 QOL 研究所³

【緒言】肝細胞増殖因子(HGF)は血管新生、抗線維化、抗炎症作用を持つことが知られており、皮膚欠損創では創傷治癒促進効果が報告されている。これまでに我々はコラーゲン/ゼラチンスポンジ(CGS)を開発し、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を徐放する有効性を報告してきた。今回、CGSのHGF単独、HGFとbFGF同時徐放能を確認し、創傷治癒に与える影響を検討した。

【方法】1.徐放実験:HGFを含浸したCGSをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に24時間浸漬後、コラゲナーゼ溶液に24時間浸漬しCGSを溶解させた。その間のCGS乾燥重量と、放出HGF量を測定した。また、HGFとbFGFの混合液を用い同様の実験を行い、同時徐放が可能か検討した。2.動物実験:C57BLマウス背部に直径8mmの全層皮膚欠損創を作成し、5群の溶液(生理食塩水[NSS群]、HGF10 μ g/cm²[HGF10群]、HGF50 μ g/cm²[HGF50群]、bFGF7 μ g/cm²[bFGF群]、HGF10 μ g/cm²+bFGF7 μ g/cm²[混合群])を含浸したCGSを貼付した。2週後に残存創面積、新生上皮長、肉芽組織の断面積、新生血管数を評価した。

【結果】CGSからのHGF、bFGF放出量はPBSに浸漬した24時間にHGF単独群ではHGF64.6 \pm 11.7%、混合液含浸群ではHGF45.5 \pm 0.9% bFGF42.5 \pm 4.4%が放出され、コラゲナーゼ浸漬24時間で残りが放出された。残存創面積はbFGF、混合群がNSS、HGF50群より有意に縮小した。新生上皮長はbFGF、混合群がNSS、HGF50群より有意に延長し、肉芽断面積はbFGF、混合群が他の3群より有意に増大し、HGF10群がNSS群より有意に増大した。新生血管数はbFGF、混合群が他の3群より有意に増加し、混合群がbFGF群より有意に増加した。

【考察】CGSからのHGF単独徐放、HGFとbFGF同時徐放が確認された。HGFの肉芽形成促進能、bFGFとHGF同時徐放での創傷治癒促進と、bFGFにHGF付加することで更なる血管新生能が確認された。今後、HGFの持つ抗線維化や抗炎症作用を確認するため、濃度、評価期間などの検討を行う予定である。

11.徐放化PRPと β -TCPとの複合体を用いたラット頭蓋骨新生促進効果

清水 梓¹、新行内芳明²、門真起子²、水野博司²

順天堂大学医学部附属浦安病院形成外科・美容外科¹

順天堂大学医学部形成外科²

【はじめに】PRPは創傷治癒促進、硬組織再生において現在急速に臨床使用が広まっている。PRPは採血した自己血から血小板を濃縮し、自己由来のサイトカインを局所で放出させる方法であるが、PRPからの成長因子放出は一過性である。またこれまでの研究で、骨誘導促進作用としての徐放化bFGFと、骨新生の足場としての β -TCPとの複合体によりラット頭蓋骨新生が促進されることを報告している。今回我々は、PRPを徐放化させ、 β -TCPとともにラット頭蓋骨欠損部に移植した。PRPから放出される成長因子が持続的に局所に作用することで、ラット頭蓋骨新生が促進されると考えて実験を行ったので、報告する。

【方法】PRP作成：F344ラットから血液採取後、抗凝固剤(EDTA-Na)と混合し、ダブルスピン法によりPRPを作製した。またこのPRPをゼラチンハイドロゲルと混合することで徐放化PRPとした。ラット頭蓋骨欠損モデル作成：10週齢オスのラット頭頂骨に直径4mmの骨欠損を作成し、各材料を埋入し閉創した。実験群はPRP群、徐放化PRP(cr-PRP)群、PRP+ β TCPブロック(β TCP)群、徐放化PRP+ β TCP顆粒(cr- β TCP)群、control群とした(n=4)。術後2、4、6、8週に頭蓋骨を採取した。 μ CTおよびHE染色標本により各群の骨新生表面積率を計測し、比較検討を行った。

【結果】 μ CTではPRP群よりもcr-PRP群で新生骨表面積率が高かった。組織学的観察における骨新生率は、PRP群よりもcr-PRP群、さらにcr- β -TCP群でより高値であった。 β -TCP群では β -TCP内に旺盛な骨形成が見られたが、骨新生率は低かった。

【結語】PRPを徐放化させて用いることで、さらに β -TCPとの複合体として用いることでラット頭蓋骨新生を促進させることが半明した。 β -TCPの形態により骨新生の程度が異なることから、最適な β -TCPの形態についても今後検討を行いたい。

12. 微細加工装置により作製したマイクロ軟骨を細胞供給源とする新規軟骨再生誘導法の開発

西脇 仁、福田智一、磯貝典孝

近畿大学医学部形成外科

【目的】軟骨組織の再生修復能は極めて低く、また軟骨欠損部への軟骨片移植の臨床成績も芳しくない。近年では幹細胞を用いた軟骨再生誘導法が有望視されているが、幹細胞単離にかかるコストや加工手技に伴う細胞汚染・細胞障害等の諸問題が指摘されている。そこで本研究では、均一サイズに加工された微細軟骨組織片（以下マイクロ軟骨と略す）を幹細胞供給源とし、さらに移植時サイトカインを併用することで、培養行程を介さない軟骨再生誘導が可能であると推測し、その至適条件について検討した。

【方法】まず軟骨を低侵襲的に微細加工する装置を作製し、至適マイクロ軟骨サイズの検討を行った。次に塩基性線維芽細胞増殖因子徐放化システムを微細加工していない従来の軟骨移植に用い、その有用性を評価した。さらに前述のマイクロ軟骨を吸収性足場材料に接着させ、マイクロ軟骨・足場材料・bFGF徐放化システムを組み合わせた移植を行い、細胞培養行程を介さない新規軟骨組織再生誘導を試みた。

【結果】マイクロ軟骨内の軟骨細胞数および細胞活性度評価より、マイクロ軟骨の至適サイズは100～400 μm 前後であると推測された。また、自家軟骨移植時にbFGF徐放化システムを併用することでSOX5活性化を伴う軟骨細胞増殖が有意に促進されることが示された。さらに、bFGF徐放化システムによるbFGF拡散の程度はマイクロ軟骨のサイズに依存し、比較的小型の100 μm 群においてSOX5発現亢進を介した軟骨再生が最も効率よく行われることが明らかとなった。

【考察】本研究により、マイクロ軟骨の至適サイズは周囲からの栄養拡散が良好でありかつ微細加工による細胞障害の影響が少ない大きさであり、さらに足場材料となるPGA不織布への接着性の良否も軟骨の再生誘導に重要な要素であると考えられた。またbFGF徐放システムの併用により、本サイトカインによる生理的組織修復機構が効率的に働き、マイクロ軟骨内に存在する幹細胞増殖が促進されることが考えられた。転写因子SOX5は前軟骨芽細胞より軟骨芽細胞への分化を決定づける重要な役割を担うとされ、本研究における軟骨再生の指標として極めて有用であった。

13.臨床応用をめざした in vivo Tissue engineering Vascularized Fat flap の作製

田中嘉雄¹、田口則行¹、永竿智久¹、赤坂喜清²

香川大学医学部形成外科¹

東邦大学大学院医学研究科先端医科学研究センター組織修復・病態制御学部門²

当科では tissue engineering chamber を用いて in vivo で vascularized soft tissue を再生する研究を行ってきた。通常 4 週間で体内に埋入した chamber を取り出すのであるが、2 年間体内に埋入した rabbit がいた。その chamber を露出したところ、chamber 内はすべて脂肪組織に置き換わり、導入した血管は脂肪組織を栄養する血管として機能していた。実験モデルは、多孔性 chamber (大きさ 4.2 × 3.2 × 0.5 cm) 内に既存の動静脈血管束を導入して、これを PRP と bFGF (controlled release) を含浸した collagen sponge で挟み込んで体内に埋入するものである。以上のことは、「chamber の形態・大きさに一致した (形態・大きさの制御)、栄養血管を持つ脂肪組織が再生され (移植可能)、長期間維持されていた (効果が持続)。また、脂肪細胞や脂肪由来幹細胞を加えていないことから、適切な環境条件下で脂肪組織が再生される (ダイレクト・リプログラミング?)」ということを意味している。そこで、1)脂肪組織の再現性、2)脂肪組織に置き換わるのに要する期間 3)再生脂肪組織を他部位へ移植した後の持続性、4)脂肪組織再生のメカニズムを明らかにする研究を行った。結果) 1)血管付加脂肪組織が再現性をもって再生された。2)脂肪置換には 12 週間を要した。3)再生部位から下腹部に有茎で移植し、5 ヶ月経過を見たところ、移植組織は吸収されることなく生着していた。4)CD34/procollagen type I の免疫染色で二重染色される細胞が認められた。以上から脂肪組織再生のメカニズムとして circulation fibrocyte の関与が示唆された。現在臨床応用に向けてミニブタを用いた実験を行っている。考察・結論) 組織欠損を治療する機会が多い形成外科では再建材料として血管が付加された組織の再生が期待される場所である。in vivo Tissue engineering Vascularized Fat flap は倫理的にも安全性においても最も臨床応用に近いと考えられる。

14.ゼラチンハイドロゲル神経チューブを足場に移植した脂肪由来幹細胞の神経再生効果と運命追跡

素輪善弘¹、田畑泰彦²、岸田綱郎³、松田 修³

京都府立医科大学形成外科¹

京都大学再生医科学研究所²

京都府立医科大学免疫学教室³

【はじめに】われわれはシュワン細胞に分化能を有する脂肪由来幹細胞に着目し、それらの神経損傷部位への移植効果について報告してきた。生体における末梢神経損傷部への移植効果を検討するためには、移植細胞の生着に適した微小環境を提供することが重要である。そこで今回、生体内吸収材料であるゼラチンハイドロゲル(GH)を用いて末梢神経損傷に対する移植用 GH tube を作成し、これを足場とし移植したうえで移植後細胞の生存と分化を追跡した。【方法】グルタルアルデヒドを含んだゼラチン水溶液に 20G 針をディップした後、これを垂直に立てかけ一晩風乾した。十分乾燥した後に針から引き抜くことでチューブ構造が作成できた。これに培地を吸収させた後に、移植する細胞を注入し、シャーレで約 3 時間インキュベートし壁に播種する。2 種類のリポーター蛍光蛋白質にて経時的にモニタリング可能な遺伝子改変マウス (GFAP- and P0 Cre double Reporter) より ADSC を分離培養し、これを 5mm の坐骨神経欠損部に移植した。これら未分化 ADSC はシュワン細胞に分化すると蛍光蛋白質が RFP から GFP にスイッチする。移植 12 週後 ADSC の生体内での動態及び Schwann 細胞への分化を解析した。【結果】5 mm の神経欠損部は再生神経線維で架橋されていた。ともに移植した GH tube は吸収されていた。移植した ADSC は 12 週間の生存・生着が再生軸索内で確認された。しかし、GFP 陽性細胞は確認されなかった。【考察】これまで神経損傷部位に神経再生を促す様々な足場材料が使用されているが、移植細胞の生着に問題があった。今回の結果から、未分化な ADSC において 12 週間の生着が確認された。しかし、一方では移植した ADSC が神経損傷部位においてシュワン細胞に分化していないことが明らかとなった。移植細胞の運命追跡のためには生着は重要である。GH は移植細胞の生着に有利な微小環境を提供している可能性があり、今後神経欠損部位へのハイブリッド型神経チューブの材料として有用であることが示唆された。

第5回 DDS 再生医療研究会の開催にあたり、上記の企業からご協賛いただきました。
深く感謝し、御礼を申し上げます。

第5回 DDS 再生医療研究会 会長 磯貝典孝