

GAG 含有ナノ粒子の創製と医療応用の可能性

石原 雅之

防衛医科大学 校防衛医学研究センター 医療工学研究部門

抗がん剤や抗菌剤等の低分子医薬に対するデリバリーシステムにおいては多くの材料が検討されており、リポソームやエマルジョン等分子集合体が臨床において既に使用されている。これに対して近年バイオ医薬として核酸やたんぱく質が注目されるようになってきた。これらの分子は低分子医薬と比較して生体内での安定性が低いことから、新たな運搬システムの開発が必要になっている。たんぱく質におけるバイオ医薬品の先駆けとして、ポリエチレングリコールで修飾したインターフェロン或いは糖鎖で修飾したエリスロポエチンが上市されており、それらはたんぱく質を化学修飾することにより体内動態と活性を制御することが可能なことから、大きな市場を獲得している。一方製造法が簡単で、多種類のバイオ医薬品に適応できるデリバリーシステムの開発も試みられ、培養細胞での実験では一部のもの高い活性発現が実現されている。しかし、生体内に投与後の *in vivo* での機能・活性発現は極めて低く、臨床への応用は困難である。

安全性に優れ、医療用注射薬としても利用されているフラグミン(低分子化ヘパリン)と、同じく注射薬であるプロタミンを適切な条件下で混合すると、フラグミンの陰電荷とプロタミンの陽電荷が結合し、混合条件によって安定なナノ粒子(80-200 nm) (F/P NPs) またはマイクロ粒子(0.5-3 μ m) (F/P MPs) が生じる。線維芽細胞増殖因子(FGF) -2 (フィブラスト[®]) や肝細胞増殖因子(HGF) を吸着、安定化させ、その活性を高めることから、FGF-2 或いは HGF 含有 F/P M/NPs の局所投与は血管新生療法や難治性創傷治療、その他再生医療にも有効であることが示されている。FGF-2 は、褥瘡・皮膚潰瘍治療剤としてすでに外用医薬品となっており、安全性に対する懸念が少なく、動物実験において、血管新生効果が確認されている。また、これらの微粒子は、血小板と複合体を形成して、その機能を活性化させることを見出した。血小板によって運搬される増殖因子は 20 を超え、血小板由来増殖因子(PDGFs), 線維芽細胞増殖因子(FGFs), 肝細胞増殖因子(HGF), トランスフォーミング増殖因子(TGFs), 血管内皮細胞増殖因子(VEGFs) 等がある。この血小板と F/P M/NPs との複合体による血小板の機能安定化の評価について実施・報告を行ってきた。そこで本研究の第一の目的は、上

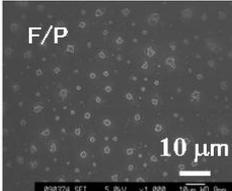
記の F/P MPs や F/P NPs に加えて、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸等の多糖等天然高分子を用いて、FGF や HGF 等の増殖因子キャリアとして最適微粒子を選択・調製していくことである。我々は多くの増殖因子を含んだ自己血漿製剤である多血小板血漿 (PRP) 含有 F/P M/NPs の肉芽組織形成、育毛促進、血管新生促進の有効性について、すでに動物実験で確認しており、一部は外用薬剤として臨床実験も行われている。

さらに、新しいタイプのバイオ医薬品として、我々は生細胞に注目した。自己細胞を使うことで、生体適合性の問題はクリアできるが、一般に生細胞を個体に戻した後の生存率、生着率は低く、実用化には問題がある。そこで、生体適合性の良い天然高分子イオン複合体を細胞修飾剤として用いることを試みたこれらの微粒子は、間葉系幹細胞等と良好に相互作用して細胞・マイクロ粒子凝集体 (スフェロイド) を形成し、浮遊培養条件下で細胞の生存性を顕著に高めることから、間葉系幹細胞移植療法のための細胞キャリアとして使用できる可能性も示唆されている。第二の目的はこれらの天然高分子複合体微粒子を用いて機能細胞、特に血小板、骨髓細胞、脂肪細胞由来間葉系細胞 (ASCs) のキャリアを開発し、その再生医療への応用を目指すことである。同時に、これらの移植用細胞スフェロイドに増殖因子等機能性たんぱく質を含有させた複合体を構築し、より高機能細胞デリバリーシステムを開発している。

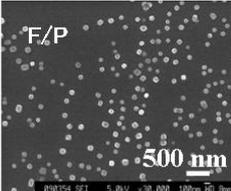
PRP及び細胞キャリアとしてのF/P MPsとF/P NPs



F/P MPs
の懸濁液

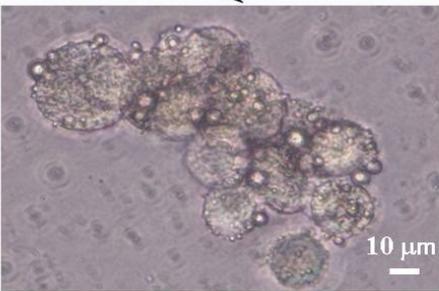


F/P
10 μm



F/P
500 nm

◆ スフェロイド化



脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ASCs) と
F/P MPsとの凝集体 (スフェロイド)

PRP (Platelet-Rich Plasma) キャリア

- 動物実験で効果的な血管新生や肉芽形成を確認。
- 自己血液製剤を利用できるため安全。
- 活性半減期が非常に短い為に毎日投与を行わないと効果が得にくい。→ F/P MPsとF/P NPsに多くの増殖因子を含んだPRPを含有させる。

PRP中の増殖因子活性を維持延長と長期に渡る徐放。

細胞キャリア

- F/P MPsとF/P NPsは細胞表面に無数に接着することで、複数の細胞/微粒子の凝集体 (スフェロイド) を形成する。細胞キャリアとしての可能性。細胞移植療法ツールとなる。

↓

PRP含有F/P微粒子 又は **スフェロイド** の局所注射による生体内投与

F/P MPsとF/P NPsのPRP及び細胞キャリアとしての効果・安全性を *in vitro* 及び *in vivo* で検討。

また、F/P M/NPsは、ガラスやプラスチック表面へのコーティング材として適用が可能である。各種細胞に接着し、細胞凝集体の形成を促進させる細胞キャリアとしての適用の可能性もあり、画期的・波及的な生体材料とすることができる。特に骨髄再生において、サイトカイン含有F/P MPsの適用は、造血系幹細胞の保護・正着・増殖に驚くべき効果を発揮することから、この細胞キャリアとしてのF/P MPsやF/P NPsの様々な疾病（難治性創傷治癒、血管新生、骨髄移植、遺伝子導入）に対する医薬品・医療補助素材としての適用の可能性を検討している。

参考文献

1. Mori, Y.; Nakamura, S.; Ishihara, M., et al. Preparation and characterization of low-molecular-weight heparin/protamine nanoparticles (LMW-H/P NPs) as FGF-2 carrier. *Int. J. Nanomed.* **2010**, *5*, 147–155.
2. Kishimoto, S.; Ishihara, M.; Nakamura, S., et al. Fragmin/protamine microparticles to absorb and protect HGF and to function as local HGF carrier *in vivo*. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 4763–4770.
3. Takikawa, M.; Nakamura, S.; Ishihara, M., et al. Enhancement of vascularization and granulation tissue formation by growth factors in human platelet-rich plasma-containing fragmin/protamine microparticles. *J. Biomed. Mater. Res. B* **2011**, *97*, 373–380.