

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12507

研究課題名(和文)マクロファージ動態を活用した革新的再生治療技術の創生

研究課題名(英文)Creation of novel regenerative therapy technology by using macrophage recruitment

研究代表者

田畑 泰彦(TABATA, Yasuhiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゼラチン誘導体と混合ミセル複合化することでスフィンゴシン-1-リン酸のタイプレセプターのアゴニストあるいはピオグリタゾン水を水可溶化した。水可溶化薬ミセル含有ハイドロゲルをマウス皮膚欠損モデルの皮膚欠損部へ投与し、M<sub>2</sub>の移動性やその機能変化、加えて、皮膚欠損部の修復について評価した。その結果、アゴニスト徐放によりM<sub>2</sub>の移動が促進され、ピオグリタゾン徐放によりM<sub>2</sub>/M<sub>1</sub>比が上昇、皮膚欠損部における組織再生修復が促されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：An agonist of sphingosin-1-phosphate type1 receptor and pioglitazone were solubilized in water by the mix micelle formation with a hydrophobic derivative of gelatin. Following gelatin hydrogels incorporating water-solubilized micelles of drugs were applied to the skin defect of mice, the in vivo migration of macrophages (M<sub>2</sub>) and the M<sub>2</sub> biofunction, as well as the repairing of skin defect. The application of the agonist release hydrogel enhanced the in vivo M<sub>2</sub> migration while that of pioglitazone release promoted the number ratio of wound healing M<sub>2</sub> to inflammation M<sub>1</sub>. The dual release of the agonist and pioglitazone significantly accelerated the repairing extent of skin defect.

研究分野：生体組織工学

キーワード：マクロファージ 体内動態 細胞機能 徐放化 ハイドロゲル

## 1. 研究開始当初の背景

創傷や病気は、必ず炎症反応をとまなう。これは治癒過程に炎症反応における血管新生や炎症細胞の活動が必須であるからである。しかしながら、この反応が強すぎたり、長引いたりすると治る創傷や病気も治らない。炎症が増悪し、慢性化する。通常の炎症反応は急性期、慢性期を経て、治癒修復に至る。この治癒修復を促し、病気の治療を行う試みが再生治療である。そのため、炎症反応のコントロールが再生治療の実現には必要不可欠である。これまで、炎症研究は、免疫学を中心に活発に行われ、免疫機能の修復を利用した免疫治療の確立も行われてきた。しかしながら、炎症と再生治療とを関係づけた研究は国内外を通して皆無である。創傷治癒修復という観点から炎症反応と再生治療との関連性は大きく、炎症の key 細胞である M の再生部位への移動に加えて、慢性化の抑制と治癒修復の促進が再生治療を強くあと押しすることは疑いない。幹細胞を用いるだけでなく、その細胞が働く部位で進行している炎症反応も含めて考えることが大切である。

この炎症反応をコントロールするのがマクロファージ (M ) である。この M の体内動態と生物機能をコントロールすることが炎症反応の制御につながると考えられる。M には、炎症を助長する慢性化 M (M1) と炎症を抑える治癒修復化 M (M2) があることがわかっている。そこで、M を必要な部位に呼び寄せ(動員)し、そこで M2/M1 の比を高めることができれば、治癒促進への炎症反応の制御がでいると考えられていた。

これまで、炎症学と再生治療とは別々に研究されてきた。しかしながら、再生修復過程は、炎症反応の結果の 1 つであり、両者を分けて研究、議論することは不可能である。近年、再生治療に期待が高まっている中で、再生治療の研究に炎症学を積極的に取り入れていないのは不思議なことであり、きわめて大きな学術的問題である。再生治療の基本アイデアは自然治癒力を高め病気の治療を行うことである。この自然治癒力の中心となっているのが増殖、分化能力の高い幹細胞である。これまでの再生治療では、この幹細胞を増し、それを移植することで再生治療を実現する試みが進められている。しかしながら、病気において必ず起こる炎症反応を無視して細胞移植を行っても、必ずしもよい結果は得られない。これは体内環境が整っていないければ、移植細胞はうまく体内で働かず、その治療効果は発揮されないからである。炎症反応は、この細胞環境に大きく影響することは自明である。急性炎症から慢性炎症へと移行する時点で、それに関与している炎症細胞 M を移動させ、もしその機能を修復過程へとスイッチングできれば、体内の再生修復環境としては、最高の条件となる。これまで、幹細胞に対する体内環境として、細胞増殖のた

めの細胞増殖因子や細胞足場などの研究開発が進められ、再生治療効果の向上に大きく貢献してきた。ところが、これに対して、再生治療において重要となる体内で進行している炎症反応に対する配慮は全く行われていなかった。

M 機能と慢性炎症との関連性についての基礎生物研究は行われているが、薬を用いて M の体内移動を修飾し、M 機能のスイッチングを行い、治癒修復を促進しようという治療的な試みはない。また、再生治療を M の体内動態の観点から考察した研究も国内外を通じて皆無である。一方、幹細胞移植による再生治療は国内外において盛んに進められている。しかしながら、その治療効果は期待されたほどには高くない。その理由の 1 つは、移植された細胞の体内環境に対する考慮が不足していることである。本研究は、重要な体内環境の 1 つである炎症反応を制御しようという試みである。基礎生物学研究から再生修復が炎症反応により修飾されることが明らかとなっている。M との相互作用により幹細胞の再生修復能が高まることも報告されている基礎生物学の知見と DDS 技術と組み合わせ、期待通りの研究成果が得られたならば、再生治療と炎症学をつなぐ新しい学問体系が構築され、M の体内動態の制御による再生治療を促す革新的な技術となる。再生治療に対する社会的要求度と期待度がますます高まっている中、その学術的・社会的意義がきわめて大きい。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症の慢性化と治癒修復化とのスイッチングで重要な役割をしている M を活用した革新的再生治療技術の創生である。この目的を達成するために、Mφ の体内移動とその生物機能を修飾するための技術を開発する。M の移動を促すとともに慢性化 M (M1) に対する修復化 M (M2) の比率を、薬を用いて積極的に高め、修復過程を促す。本研究では、スフィンゴシン-1-リン酸あるいはそのレセプターに対するアゴニストなどの M の移動を高める薬やピオグリタゾンなどの M2 比率を高める薬を生体吸収性高分子ハイドロゲルから徐放化することで、薬の体内作用を高める。この徐放システムによる M の移動と M2/M1 比の変化を in vitro 細胞培養と動物実験にて評価する。加えて、骨欠損モデルを用いて M の体内移動と修復化 M 比が幹細胞移植による組織再生修復に与える効果を検討する。近年の M 生物学の進歩により、M の体内動態や慢性化や修復化 M についての知見が集結されている。また、M との相互作用により幹細胞の創傷治療能が促されることもわかっている。これまでに、私たちは生体吸収性ハイドロゲルを用いて、種々の薬の徐放化についての研究開発を行ってきた。この様な状況の中で、薬をうまく働かせるドラ

ッグデリバリーシステム(DDS)技術を活用し、M の体内移動と M 機能のスイッチングが可能となれば、炎症の観点からの再生治療のための体内環境が整い、細胞移植による治癒修復が促進できるのではないかとこの着想に至った。

本研究の目的は、炎症反応からみた再生治療技術の開発である。そのために考えた斬新的なアイデアは、慢性炎症から創傷修復期への移行に重要な役割を果たす M の活用である。薬によって M の体内動態とその修復化機能を高め、それにより体内環境を自然修復過程へと導くことである。M の移動と機能を修飾できる薬を生体に安全で毒性のない生体吸収性高分子ハイドロゲルで局所徐放化させることで、M の体内移動と慢性化 M に対する修復化 M の比率を高める。M の修復機能を高めた状態で幹細胞移植することによる組織の再生修復効果を評価する。現在、慢性炎症と M との関連性が、生物学における 1 つのトピックスとなっている。炎症を慢性化させず修復期へと移行させることが再生治療を促すエッセンシャルであることは疑いない。加えて、M が創傷治療過程で働く幹細胞と相互作用し、その再生修復を助けていることもわかっている。本研究は、炎症反応を制御することによる新しい再生治療概念を提案することができる。それに加えて、これまでの細胞増殖因子や足場による体内の再生修復環境の構築技術に相乗的に働く新しい研究分野の開拓に向けた萌芽的挑戦であると考えられる。

われわれは、これまでゼラチンハイドロゲルを用いた細胞増殖因子などの薬の徐放化とその技術による再生治療の重要性と有用性を実験的および臨床的に示してきた。これらの一連の研究により得られた研究成果と技術を基に M の体内動態と機能を修飾する薬の作用発現を高めることは可能である。一方、これまでの研究から、M 修飾薬により M の体内動態を修飾し、慢性化 M1 と修復化 M2 との比率を変更できることは確認されている。この発想を実現させるために必要となる M の取り扱い、M の生物機能の評価などについてはすでに修得している。本研究は、これまでに得られている研究成果と技術を組み合わせることにより、炎症からみた再生治療を可能とするチャレンジングではあるが、新しい原理と斬新な技術の開発である。

### 3. 研究の方法

(1) 難水溶性のスフィンゴシン-1-リン酸およびそのタイプ レセプターアゴニスト

あるいはピオグリタゾンなどを M 修飾薬として取り上げる。前者の 2 つの薬は M の移動を促し、後者は M1、M2 機能の調節にかかわっていることがすでに基礎生物学の研究結果からわかっている。ポリ乳酸あるいはコレステロールを化学導入したゼラチンの疎水性誘導体を作製する。難水溶性薬をゼラチン誘導体と混合ミセル複合化することで薬の水可溶化を行う。

(2) 得られた水可溶化 M 修飾薬ミセルをゼラチン水溶液に混合、それを凍結乾燥する。この凍結乾燥ゼラチンを熱脱水処理によって化学架橋を行い、水可溶化 M 修飾薬ミセル含有ハイドロゲルを作製する。ハイドロゲル作製時の架橋条件を変えることで、ハイドロゲルの生体吸収性や M 修飾薬の徐放性を変化させる。

(3) 動物骨髄から細胞を単離、常法によるインターロイキン刺激により M を調製する。水可溶化 M 修飾薬ミセル含有ハイドロゲルとともに M を培養することで、M の移動性や機能変化について、生化学的および分子生物学的に評価する。M 移動性はデフュージョンチャンパー法を用いて調べる。修復化 M (M2) と慢性化 M (M1) との比率は、それぞれの機能マーカーである CD206 発現、アルギナーゼ分泌、腫瘍壊死因子 (TNF) やインターロイキン (IL) 10 の分泌、および一酸化窒素 (NO) の産生で評価する。

(4) M 修飾薬の投与量、徐放性が M 移動と機能に与える影響について、M 培養実験により検討し、M の移動性と M2/M1 比率を高めるための条件の最適化を行う。

(5) 前年度と今年度の成果をまとめて、M 機能修飾薬の徐放化を利用した再生修復について必要要素を整理する。これによって、総合的に炎症反応機能を修飾することによる再生治療技術の創製のための挑戦的萌芽技術の最適化を行う。

### 4. 研究成果

(1) M 移動促進として、難水溶性のスフィンゴシン-1-リン酸のタイプ レセプターアゴニストあるいは、M1、M2 機能修飾薬として、ピオグリタゾンを取り上げた。ポリ乳酸あるいはコレステロールを化学導入したゼラチンの疎水性誘導体を作製した。難水溶性薬をゼラチン誘導体と混合ミセル複合化することで薬の水可溶化が可能となった。

(2) 得られた水可溶化 M 修飾薬ミセルをゼラチン水溶液に混合、それを凍結乾燥した後、熱脱水処理によって化学架橋を行い、水可溶化 M 修飾薬ミセル含有ハイドロゲルを作製した。ハイドロゲル作製時の架橋条件を変えることで、ハイドロゲルの生体吸収性や M 修飾薬の徐放性を変化させることができた。

(3) 動物骨髄から細胞を単離、常法によるインターロイキン刺激により M を調製した。水可溶化 M 修飾薬ミセル含有ハイドロ

ゲルとともに M を培養し、M の移動性や機能変化について、評価した。機能マーカーである CD206 発現、アルギナーゼ分泌、腫瘍壊死因子(TNF)やインターロイキン(IL) 10 の分泌、および一酸化窒素(NO) の産生で評価した。その結果、アゴニストの徐放化により M の移動は促進され、ピオグリタゾン徐放化により M2/M1 比の高まることがわかった。得られた薬徐放化ハイドロゲルをマウス皮膚欠損モデルに投与した後、欠損部位での M 移動および M 機能について調べた。その結果、アゴニスト徐放化によって M の移動が促進され、ピオグリタゾン徐放化によって M2/M1 比が増大することがわかった。これらの作用により、結果としてマウス皮膚欠損部の再生修復が増強された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kim, Y.H., Furuya, H., Tabata, Y. : Enhancement of bone regeneration by dual release of a macrophage recruitment agent and platelet-rich plasma from gelatin hydrogels. Biomaterials. 査読有. **35** 巻. 2015. 214-224

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.103

Sakai, S., Sato, K., Tabata, Y., Kishi, K. Local release of pioglitazone (a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist) accelerates proliferation and remodeling phases of wound healing. Wound Repair Regen. 査読有. 24 巻. 2016. 57-64

DOI: 10.1111/wrr.12376

Kim, Y.H., Tabata, Y. Recruitment of mesenchymal stem cells and macrophages by dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophage recruitment agent enhances wound closure. Journal of Biomedical Materials Research Part A 査読有. 104 巻. 2016. 942-956

DOI: 10.1002/jbm.a.35635

〔学会発表〕(計 2 件)

城潤一郎、青木伊知男、佐賀恒夫、田畑泰彦、ナノ粒子による単球/マクロファージのがん組織内への誘引と活性化を用いたがん治療の試み 第 36 回日本炎症・再生医学会、東京、2015 年 7 月 21 日-22 日

田中隆介、Kim Yanghee、田畑泰彦、難水溶性薬剤の徐放化による炎症部位へのマクロファージ動員促進 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、福岡、2016 年 11 月 21-21 日

田中隆介、Kim Yanghee、田畑泰彦、マクロファージ動員のための難水溶性薬剤徐放システムの開発 第 32 回日本 DDS 学会学術集会、静岡、2016 年 6 月 30 日-7 月 1 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)  
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・  
教授

研究者番号：5 0 2 1 1 3 7 1

(2) 研究分担者

山本 雅哉 (YAMAMOTO, Masaya)  
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・  
准教授

研究者番号：1 0 3 3 2 7 3 5

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし