

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21212

研究課題名(和文) マクロファージ機能のスイッチング作用を有するチタン製インプラントの創製

研究課題名(英文) Nanotechnology to facilitate bone tissue regeneration through polarization of macrophage phenotype

研究代表者

戸井田 力 (Riki, Toita)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：40611554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：チタンあるいはPEEK表面の親水性および表面粗さはMSCの骨分化に対してはポジティブな影響を与えるが、マクロファージに対する抗炎症効果は材料の親水性がより顕著な効果を与えると結論付けた。ホスファチジルセリン(PS)ナノ粒子をチタン表面に修飾する技術を開発した。PSナノ粒子修飾チタン上で、M2型マクロファージを誘導できることが明らかとなった。ラットの大腿骨骨髓腔に材料を埋植し、骨再生の詳細を病理組織学的に評価した。修飾チタン周囲では未修飾チタンと比較して、著しい新生骨の再生が認められた。以上より、マクロファージ表現型の制御を介した骨再生の促進に成功した。今後、詳細なメカニズム解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：Osteogenesis of mesenchymal stem cells was activated through increasing surface hydrophilicity and surface roughness of titanium and PEEK. Increase in hydrophilicity of biomaterials reduced inflammatory responses of macrophage, whereas surface roughness did not. Nanoparticles (NPs) possessing anti-inflammatory activity can be modified on titanium using a layer-by-layer method. Interestingly, titanium modified with NPs can polarize M1 type macrophage to M2 type which enhances osteogenesis of MSCs and pre-osteoblasts through growth factors. In animal experiments, the modified titanium facilitated new bone formation when compared with pristine titanium. In summary, we can develop new method to increase osseointegration activity of titanium implant through changing macrophage phenotype.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：再生医療 炎症 マクロファージ 硬組織インプラント ナノメディシン

1. 研究開始当初の背景

口腔インプラントによる補綴歯科治療は、歯列欠損に起因する機能的・審美的な障害の有効な治療法である。即時インプラントなどの临床上の要求からインプラントの骨伝導性を向上させる技術開発は社会的要請である。

骨免疫学研究の進展に伴い、マクロファージ(M)が液性因子により、骨芽細胞、破骨細胞の機能を制御することで、骨再生に強く影響を与えることが明らかになってきた。インプラントの表面構造や物理化学的性質は、Mの表現型に影響を与え、周囲骨の再生速度は劇的に変化する。興味深いことに、幹細胞の増殖・骨芽細胞への分化に優れるインプラントよりも、Mを組織修復型(M2型)に変換する作用に優れるインプラントの方が、早期の周囲骨組織の再生を達成できることが報告された。すなわち、インプラント表面はM等の早期に付着する細胞に対してより直接的な影響があることを示唆している。しかしながら、Mの表現型を制御可能なインプラントはこれまで例がない。

Mは2種類に大別され、M1型が炎症の慢性化に寄与するのに対し、M2型は組織再生を促進する。消炎～組織再生過程において、アポトーシス細胞はMにより貪食される(図1)。このとき、Mはアポトーシス細胞表面に提示されたホスファチジルセリン(PS)を認識し、M2型となり、抗炎症性サイトカイン・増殖因子(BMP-2など)を産生し、消炎とともに組織再生促進に関与する。一方、アポトーシス細胞が速やかに処理されないと、M1型に変換され、炎症が慢性化し、組織破壊が進行する。例えば、IL-1、-6、TNF等の炎症性サイトカインは破骨細胞の活性を亢進する。PSと同様に、リゾルピンD(RvD)、マレーシンも、M2型M誘導により消炎・組織再生に関与するが、PSとは異なった受容体に結合し、M2型への変換を相乗的に活性化する。

これまでに、申請者は、炎症 消炎 再生過程における生理活性脂質の重要性に着目し、Mの表現型を制御可能なナノ粒子を設計し、炎症性疾患(心筋炎、肥満)治療への応用を行ってきた。PSを含有したナノ粒子をM1型に添加すると、炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF)の減少とともに抗炎症性サイトカイン(IL-10)の増加が認められ、M2型に変換されることが分かった。

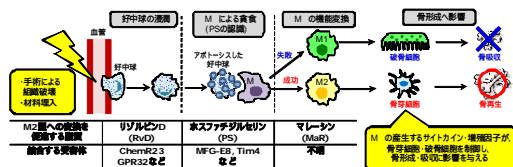


図1. マクロファージの表現型と骨関連細胞への影響

2. 研究の目的

Mは炎症の慢性化と組織再生とのスイッチングで重要な役割を担っており、生体材料埋入直後には炎症性のM1型が亢進する。したがって、申請者は、このM1型を組織修復M2型に変換する技術が開発できれば、目的組織の再生が促進されると考えた。当該研究では、PSナノ粒子を応用し、「Mの表現型の制御に基づくインプラント周囲骨の再生促進技術の創製」を目的とした。

3. 研究の方法

3-1 インプラントの親水性と表面構造が間葉系幹細胞(MSC)の骨分化とマクロファージの表現型に与える影響について

チタンをオゾン処理することで、表面の親水性を増大させた。未修飾チタンとオゾン処理チタン上で、MSCを培養し骨分化に与える影響を調査した。細胞増殖、ALP活性、骨様結節形成を指標とした。また、RAW264.7マクロファージ細胞株を同様に材料上に培養し、炎症性サイトカイン産生を調査した。また、ポリエーテルエーテketon(PEEK)の表面構造がMSCの骨分化とマクロファージの炎症性サイトカイン・ケモカイン産生に与える影響を同様に調査した。

3-2 PSナノ粒子とタンパク質の複合化

サイトカイン等の生理活性タンパク質をマクロファージに選択的に作用させる技術の開発を行った。タンパク質をパルミチン酸で疎水化した。疎水化タンパク質とPSナノ粒子を混合することで複合化できるか調査した。また、IL-10複合化PS粒子(IL-10@PS)については、細胞実験にて抗炎症効果を調査した。

3-3 PSナノ粒子修飾チタンの調製と細胞実験

チタンをPSナノ粒子溶液とポリカチオン溶液に交互浸漬することで、PSナノ粒子を積層させた。修飾チタン上に、RAW264.7マクロファージ細胞あるいは骨髄由来マクロファージを培養し、所定の時間で培地を回収した。培地中に分泌された各種サイトカイン濃度をELISAにて測定した。また、NO産生量をグリース・ロミン亜硝酸試薬を用いて算出した。

3-4 PSナノ粒子修飾チタンの動物実験

本動物実験は、産業技術総合研究所の実験動物委員会の許可のもと、国際標準基準 Principles of Laboratory Animal Care (National Society for Medical Research) および Guide for the Care and Use of Laboratory Animal (National Institute of Health Publication No. 86-23)を遵守するとともに、所属機関の動物実験倫理規定等に従い実施した。

チタン丸棒(1.4 mm X L 23 mm)表面に、

PS ナノ粒子を修飾した。F344 ラット (12~15 週齢、オス) の大腿骨骨髓腔をドリルで穴をあけ、チタン丸棒を埋植した。1, 2 および 4 週間後に、ラットを屠殺し、骨組織と材料を一塊に回収した。回収した組織の病理切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色あるいはマッソン・トリクローム染色し、骨再生の詳細を評価した。また、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 酵素染色を行い、TRAP 陽性多核巨細胞 (破骨細胞) 数を比較した。

#### 4. 研究成果

4 - インプラントの親水性と表面構造が間葉系幹細胞 (MSC) の骨分化とマクロファージの表現型に与える影響について

チタンをオゾン処理すると、水の接触が 0° となり、超親水性を示すことが分かった。X 線光電子分光法を用いて、表面の元素組成および官能基を評価したところ、水酸基の増大が認められ、超親水性は水酸基の増大に起因することが明らかになった。オゾン処理チタンは未処理チタンと比較して、細胞増殖速度が増大するとともに、細胞がより伸展していることが分かった。また、オステオカルシン産生と骨様結節形成が増大することが分かった。一方、マクロファージの炎症性サイトカイン産生 (TNF および IL-6) は、オゾン処理チタン上で減少する傾向があった (図 2)。培地中のタンパク質は材料表面に吸着すると、構造が編成する。変性タンパク質はマクロファージ表面の受容体 (たとえば、Mac-1) に認識されると、炎症を増大することがすでに分かっている。オゾン処理チタンは超親水性を有するため、タンパク質が材料表面に吸着する際に構造の変性が限定的である。したがって、材料の親水性はタンパク質の変性を抑制することで、マクロファージの炎症を抑制すると推察された。

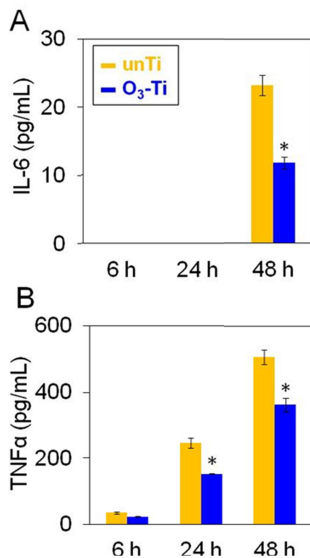


図 2. 超親水性表面を有するオゾン処理チタンの抗炎症効果

一方、PEEK をサンドブラストすることで、粗い表面構造を有する PEEK を作製した。未処理 PEEK と比較して、サンドブラスト PEEK は、優れた骨分化促進性を有していることが明らかになった。一方、マクロファージの炎症に対する影響を調査したところ、TNF および IL-6 産生に与える影響は限定的であり、炎症性ケモカイン MCP-1 (CCL-2) のわずかな減少が認められた程度であった (図 3)。

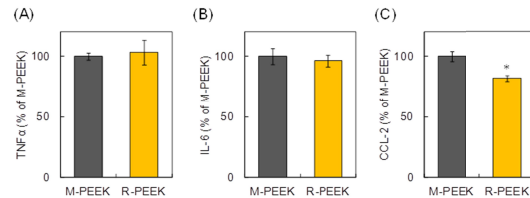


図 3. 表面粗さが炎症性サイトカイン・ケモカイン産生に与える影響。M-PEEK: 鏡面研磨、R-PEEK: サンドブラスト。

以上の結果より、材料表面の親水性および表面粗さは MSC の骨分化に対してはポジティブな影響を与えるが、マクロファージに対する抗炎症効果は材料の親水性がより顕著な効果を与えると結論付けた。しかしながら、使用した材料の種類やパラメーターが限定的であり、本結論を支持するよりシステムティックな実験が必要であろう。

#### 4 - PS ナノ粒子とタンパク質の複合化

疎水化したタンパク質と PS ナノ粒子を混合し 30 分間静置させた (図 4)。PS ナノ粒子表面に修飾されたタンパク質の修飾率を算出したところ、約 90% であった。抗炎症性サイトカイン複合化 PS ナノ粒子の抗炎症性作用を評価した。IL-10 単独、PS ナノ粒子単独と比較して、IL-10@PS は TNF および IL-6 産生の抑制効果が増大した。この傾向は *in vivo* でより顕著であった。



図 4. PS ナノ粒子表面へのタンパク質修飾

#### 4 - PS ナノ粒子修飾チタンの調製と細胞実験

XPS 分析により、チタン表面に PS ナノ粒子を積層できているか評価した。未修飾チタンは酸化チタン層に由来する Ti2p および O1s ピークと空気中の炭化水素成分の吸着に由来する C1s ピークが検出された。一方、修飾チタンは、積層回数に依存して Ti2p ピークの減少が認められるとともに、PS ナノ粒子由来の P2p、N1s、C1s の増大が認められた。以上より、PS ナノ粒子が積層されていることが

明らかになった。

マクロファージを材料上に培養し、LPS あるいは IFN- $\gamma$ /LPS で刺激して、M1 型マクロファージを誘導した。M1 型マクロファージは、炎症性サイトカインや NO を産生するが、M2 型マクロファージは抗炎症性サイトカインや増殖因子を産生する。未修飾チタンと比較して、修飾チタン上では、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1 (CCL-2) などの炎症性サイトカイン産生が減少し、IL-10、TGF- $\beta$  などの抗炎症性サイトカイン産生が増強した。このサイトカイン産生の増減は、PS ナノ粒子修飾量に依存した。また、NO 産生も炎症性サイトカインと同様の傾向を示した。以上の結果より、PS ナノ粒子修飾チタン上で、M2 型マクロファージを誘導できることが明らかとなった。

#### 4 - PS ナノ粒子修飾チタンの動物実験

ラットの大腿骨骨髓腔に修飾チタンおよび未修飾チタンを埋植し、骨再生の詳細を病理組織学的に評価した。修飾チタン周囲では未修飾チタンと比較して、1 および 2 週間後において、著しい新生骨の再生が認められた。未修飾チタンでは、大腿骨近位端の新生骨形成はほぼ無かったが、修飾チタンでは大腿骨近位端の再生も認められた。さらに、埋植 1 カ月後の骨-インプラント結合率を算出したところ、修飾チタンで約 5 倍の増大が認められた。以上より、PS ナノ粒子修飾は、チタンの骨伝導性を増大できると結論付けた。一方、骨吸収を行う破骨細胞の数を比較したところ、埋植 1 および 2 週間後において、修飾チタンで減少する傾向があり、新生骨形成の増大の一部は破骨細胞数の減少であることが分かった。破骨細胞の分化は、各炎症性サイトカインで活性化することから、PS ナノ粒子のマクロファージに対する抗炎症効果が間接的に破骨細胞の活性に影響を与える可能性がある。

*in vitro* において、PS ナノ粒子は M2 型マクロファージを誘導できることが明らかとなったが、*in vivo* におけるマクロファージ表現型を評価するには至らなかった。今後、マクロファージ表現型と骨関連細胞、骨伝導性の調査を行うことで、PS ナノ粒子修飾による骨伝導性の向上の一連のメカニズムを明らかにする必要がある。

#### 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 4 件)

\*責任著者

Sunarso, Riki Toita, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa, A superhydrophilic titanium implant functionalized by ozone gas modulates bone marrow cell and macrophage responses, *Journal of Materials Science: Materials in Medicines*,

27, 127-135 (2016).

Riki Toita, Takahito Kawano, Masaharu Murata, Jeong-Hun Kang, Anti-obesity and anti-inflammatory effects of macrophage-targeted interleukin-10-conjugated liposomes in obese mice, *Bioamaterials*, **110**, 81-88 (2016).

Riki Toita, Takahito Kawano, Satoshi Fujita, Masaharu Murata, Jeong-Hun Kang, Increased hepatic inflammation in a normal-weight mouse after long-term high-fat diet feeding, *Journal of Toxicologic Pathology*, **31**, 43-47 (2018)

Sunarso, Akita Tsuchiya, Naoyuki Fukuda, Riki Toita, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa, Effect of micro-roughening of poly(ether ether ketone) on bone marrow derived stem cell and macrophage responses, and osseointegration, *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, **29**, 1375-1388 (2018).

[学会発表](計 5 件)

姜 貞勲・河野 喬仁・村田 正治・戸井田 力, マクロファージを標的とする IL-10 修飾リポソームの抗肥満・抗炎症効果, 第 39 回日本分子生物学会年, 横浜, 2016.12.

姜 貞勲・戸井田 力・浅井 大輔・村田 正治, マクロファージを標的とする eat-me シグナルナノ分子, 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 静岡, 2016.06.

戸井田 力・藤田 聡史, 骨伝導性と抗炎症性を有するカルシウムイオン修飾 PEEK, 第 10 回 バイオ関連化学シンポジウム, 金沢, 2016.09.

戸井田 力・藤田 聡史・姜 貞勲, 炎症性疾患治療を指向したマクロファージ機能制御剤の基礎評価, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山, 2016.09.

姜 貞勲・河野 喬仁・村田 正治・戸井田 力, マクロファージを標的とする IL-10 修飾リポソーム, 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 京都, 2017.07.

[図書](計 1 件)

Jeong-Hun Kang, Riki Toita, Takahito Kawano, Masaharu Murata, Nanomaterials and Regenerative Medicine, IAPC publishing.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bmd/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

戸井田 力 (TOITA, Riki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：40611554