

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19925

研究課題名（和文）線維症先制治療バイオマテリアルの開発

研究課題名（英文）Biomaterials for preemptive treatments of fibrosis

研究代表者

長濱 宏治（NAGAHAMA, KOJI）

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：00551847

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：アニオン性のナノ粒子LAPONITEと生分解性高分子PLGA-PEG-PLGAを複合したハイドロゲル炎症部位に投与すると、カチオン性のTGF- β 1をLAPONITEが吸着してゲル内に濃縮し、周辺組織への拡散を防ぐと共に、PLGA-PEG-PLGAゲルネットワークが物理的なバリアとなって線維芽細胞のゲル内侵入を防ぐことで、線維芽細胞の活性化が抑制され、線維症の発症を防いだ。このゲルは分解性で、線維化を防いだ後は分解・消失するため、組織再建には干渉せず、複合ゲルは組織再生を誘導した。これまでに、細胞移植なしで皮膚の再生を誘導する技術はなく、複合ゲルは皮膚再生技術を開発する上で有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の線維症研究では、線維化が起こった後にTGF- β 1と線維芽細胞を薬剤で阻害する戦略が用いられている。これに対して、本研究で提案する『局所作用型バイオマテリアルを用いて、TGF- β 1と線維芽細胞の時空間的配置を制御するマイルドな方法で、TGF- β 1による線維芽細胞の活性化を慢性炎症部位局所的に防ぎ、副作用なしで線維化を未然に防ぐコンセプト』は世界初である。線維症発症の機構はすべての組織で共通しているため、複合ゲルは心臓、肝臓、腎臓などにも適用できると期待される。将来的に線維症先制治療技術を開発できれば、線維症関連分野の基礎および応用研究にパラダイムシフトをもたらす。

研究成果の概要（英文）：When a hydrogel composed of anionic nanoparticles LAPONITE and biodegradable polymer PLGA-PEG-PLGA is administered to an inflamed site, LAPONITE adsorbs cationic TGF- β 1, concentrating it in the gel, and preventing it to transmit surrounding tissues. In addition to preventing diffusion, the PLGA-PEG-PLGA gel network acted as a physical barrier to prevent fibroblasts from entering the gel, suppressing fibroblast activation and preventing the onset of fibrosis. This gel is degradable and disappears after preventing fibrosis, so it does not interfere with tissue reconstruction, and the composite gel induces tissue regeneration. To date, there is no technology to induce skin regeneration without cell transplantation, and the composite gel is useful in developing skin regeneration technology.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：線維症 先制治療 TGF- β 1 線維芽細胞 ハイドロゲル PLGA-PEG-PLGA LAPONITE

1. 研究開始当初の背景

線維症は、慢性炎症にตอบสนองした線維芽細胞によるI型コラーゲンの過剰な沈着によって引き起こされる組織の硬化である。線維症はすべての組織で発症し、患者数は国内で200万人以上と推定されている。強い慢性炎症が起きている組織には過剰なTGF- β 1が存在し、周辺に拡散したTGF- β 1は線維芽細胞を活性化し、I型コラーゲンの産生が亢進する。過剰なI型コラーゲンが組織沈着した結果、組織は線維化して、機能が低下する(線維症)。また、線維化サイクルにより線維症は悪性化する。線維化した組織は元の正常組織には戻らず、悪性化すると死に至ることもある。TGF- β 1による線維芽細胞の活性化は線維化の主要因であるため、従来の線維症治療研究では、TGF- β 1と線維芽細胞の働きを薬剤により阻害し、線維症の悪性化を防ぐ戦略がとられている。しかし、従来法には本質的な問題がある。問題：線維化が生じた後に悪性化を防ぐ目的で治療を開始するため、線維化した組織を元の正常な組織に戻せない。問題：薬剤により、正常組織を含む全身でTGF- β 1と線維芽細胞を阻害するため、全身で強い副作用が生じる。以上の背景より、応募者は、線維化が生じた後ではなく、線維症の開始反応である慢性炎症時に治療を開始し(先制治療：問題の解決)、さらに薬剤ではなく、バイオマテリアルを用いて炎症組織局所的に、TGF- β 1と線維芽細胞の時空間配置を制御するマイルドな方法で線維芽細胞を活性化させなければ(問題の解決)、副作用なしで線維化を未然に防ぐことができ、従来法の問題を解決した画期的な線維症治療技術が創出できると考えた。

本新規コンセプトの有効性を検証するため、生分解性高分子の poly(lactide-co-glycolide)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(lactide-co-glycolide) (略称：PLGA-PEG-PLGA) と強いアニオン性のナノ粒子 LAPONITE から成る複合ゲルを設計し、本コンセプトの実現可能性を検証した。

2. 研究の目的

本研究課題では、(1)複合ゲルが線維化を防ぐ作用メカニズムの全容を解明し、また(2)複合ゲルが線維症先制治療バイオマテリアルとして有効な組織を解明する、ことにより、複合ゲルを用いた線維症先制治療バイオマテリアルの開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 複合ゲルが線維化を防ぐメカニズムの全容を解明する

本研究項目では、損傷を伴う組織の慢性炎症部位に複合ゲルを投与した後、どのような生体分子や細胞がどのような反応を行い、どのようなカスケードにより組織レベルの応答(線維化抑制)につながったのか、その全容を理解するため、複合ゲルの有効性を確認している皮膚線維化モデルマウス系で、以下の内容(1-1および1-2)を解明する。特に、線維化に関連すると報告されている生体分子や細胞に着目し、免疫染色、組織学的解析、遺伝子発現解析、タンパク質発現解析などにより、時間と空間に着目して定量評価する。具体的には、TGF- β 1および線維芽細胞に加えて、慢性炎症組織で過剰に存在し、線維化に関連する炎症性サイトカインIL-6と炎症性M1マクロファージに注目している。実験により得られた結果を既知の知見と統合して理解を深め、複合ゲルが線維化を防ぐ作用メカニズムの全容を解明する。さらに、解明したメカニズムに基づき、有効性の向上を目指して複合ゲルの材料設計を改良する。

(1-1) どのような生体分子や細胞がどの段階(時間)で、組織内のどこ(空間)に存在するのか。

(1-2) 生体分子や細胞の時空間的な動態(存在量、相互作用、分化、組織化など)。

(2) 複合ゲルが線維症先制治療バイオマテリアルとして有効な組織を解明する

すべての組織で線維化メカニズムは共通すると報告されているため、複合ゲルは有効性を実証している骨格筋や皮膚に加えて、マルチな組織の線維症に適用できると期待される。研究項目(1)で得られる作用メカニズムの知見を活かせば、複合ゲルが有効性を示す組織を合理的に予測できるため、本研究項目では、複合ゲルがどの組織に対して効果的に線維化を防ぐのか、線維症の発症頻度が高い心臓、肝臓、腎臓、肺、神経、軟骨などを対象に、各種モデルマウスを用いて複合ゲルの線維症先制治療バイオマテリアルとしての有効性を解明する。特に、線維化が致命的で患者数が多く、新しい線維症治療技術の開発が必要とされている心臓(2-1)と肝臓(2-2)を優先する。

(2-1) 左冠動脈の永久結紮により作製した心筋線維化モデルマウスの慢性炎症部位に複合ゲルを投与し、経時的に心臓の機能解析を行う。また、経時的に心臓の組織学的解析、細胞や分子の免疫染色、遺伝子発現解析などにより、機能との相関を調べる。

(2-2) 四塩化炭素の腹腔内頻回投与により作製した肝臓線維化モデルマウスの慢性炎症部位に複合ゲルを投与し、経時的な血液検査により肝機能を調べる。また、経時的な組織学的解析、細胞や分子の染色、遺伝子発現解析などにより、機能との相関を調べる。

4. 研究成果

以下すべての実験で、10%の PLGA-PEG-PLGA と 1.1%の LAPONITE を複合したゲルを用いた。また、コントロールゲルとして、LAPONITE を複合していない PLGA-PEG-PLGA 単独ゲルを用い、複合ゲルの結果と比較検討した。はじめに、メカニズム解明のための実験として、複合ゲルが線維芽細胞のゲル内遊走を防ぐことができるのか検証した。Transwell 内で作製した複合ゲルの上に線維芽細胞を播種し、遊走によりゲルを通過して Transwell の下側に移動してきた細胞数をカウントした。その結果、播種から 14 日後でも、単独ゲル及び複合ゲル内への遊走細胞数は、1 mm²あたりそれぞれ 11 個、および 1 個であった。この結果より、細胞にとって足場にならないゲルネットワークを持つ単独ゲル及び複合ゲルは、線維芽細胞のゲル内遊走を物理的に防ぐことが可能だと示唆された。

次に、複合ゲルの TGF- β 1 吸着特性を評価した。TGF- β 1 溶液をゲル上へのせ、所定時間後に上清を回収して ELISA により定量解析した。7 日後の吸着量を比較すると、LAPONITE を含まない PLGA-PEG-PLGA 単独ゲルでは吸着量が 10 pg であったのに対し、複合ゲルでは約 72 pg を吸着した。これより、期待した通り複合ゲルは、LAPONITE との相互作用にもとづき TGF- β 1 を効果的にゲル内に吸着・濃縮することが明らかになった。

上記の *in vitro* 実験結果より、複合ゲルがコンセプトに基づいた性質を示すことが明らかになったため、次に、複合ゲルの線維化抑制効果を検証した。皮膚の創傷後に線維化が起こるモデルマウスを作成し、初期の炎症段階で損傷部位に複合ゲルを投与することで線維化抑制効果を調べた。投与 23 日後に再建した組織をとりだして切片を作製し、masson trichrome 染色にてコラーゲンを染色し、画像より再建部位のコラーゲン占有率を定量したところ、ポリマー単独ゲルでは、線維化モデルと同じように、コラーゲンの過剰沈着が見られ、大部分をコラーゲンが占有する線維化皮膚が再建された。一方で、複合ゲルを投与した場合、コラーゲンの過剰沈着はまったくみられず、正常な皮膚と同じように、適切な位置に、適切な割合でコラーゲンが存在していたことから、複合ゲルはほぼ完全に線維化を防ぐことがわかった。さらに、HE 染色画像をみてみると、驚くべきことに複合ゲル投与で再建した皮膚には、正常な皮膚に見られるような表皮・真皮・皮下脂肪組織の階層や、分泌腺・毛包のような付属器が確認された。この結果より、複合ゲルは線維化を防ぐだけでなく再生を誘導することが分かった。これまでに、細胞移植なしで皮膚の再生を誘導する技術は存在しないため、複合ゲルは皮膚再生技術を開発する上でも有用なバイオマテリアルである。複合ゲルが線維化抑制の過程で、コンセプト通りの働きをしているのか調べた。具体的には、創傷から組織再建の過程で経時的に組織切片を作成し、抗 TGF- β 1 抗体と抗線維芽細胞抗体を用いて免疫染色を行った。その後、得られた画像から、損傷部位の TGF- β 1 占有率および線維芽細胞占有率を定量した。その結果、初期炎症が生じている創傷 1 日後及び 4 日後において、複合ゲル投与群は無処置と比較して高い TGF- β 1 占有率を示し、TGF- β 1 がゲル内に濃縮されていると考えられる。また、同じ日で線維芽細胞の占有率をみると、複合ゲル投与群は、無処置群と比較して優位に低い占有率を示した。これらの結果より、複合ゲル群ではコンセプト通り、生体内でも初期の炎症段階にてゲル内に TGF- β 1 を吸着・濃縮すると共に、線維芽細胞のゲル内遊走を抑制することで、TGF- β 1 と線維芽細胞が出会わない環境を構築していると考えられる。さらに、筋線維芽細胞マーカーとして知られる α -SMA 陽性の線維芽細胞の占有率をしてみると、損傷 7 日後には無処置群では高い占有率となり、その後も損傷 18 日後まで高い占有率を維持した。一方、複合ゲル群では損傷 7 日後時点でほとんど α -SMA 陽性線維芽細胞が見られず、その後も優位に低い占有率を示した。このことから、複合ゲル群では損傷部位で TGF- β 1 と線維芽細胞が出会わない環境を提供したことで、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を抑制したと考えられる。また、上記のメカニズムは、心臓および肝臓にも適応でき、複合ゲルが線維化を防ぐことが示唆された。

PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合ゲルは、LAPONITE が TGF- β 1 をゲル内に吸着して周辺組織への拡散を防ぐと共に、線維芽細胞にとって足場にならない PLGA-PEG-PLGA ゲルネットワークが線維芽細胞のゲル内侵入を防ぎ、TGF- β 1 と線維芽細胞が出会わない環境を提供することで、皮膚の線維化を防ぐというメカニズムを解明した。さらに、線維化を未然に防いだ結果として、皮膚再生を誘導することが明らかになった。複合ゲルは線維症先制治療材料として、高いポテンシャルをもっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野 公佳、土出 龍弥、吉信 尚洋、西田 ひなの、片山 論陵、上田 菜摘美、長濱 宏治
2. 発表標題 線維化を防ぎ、再生を誘導する新奇ゲル材料の開発
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

甲南大学研究者情報 https://researchers.adm.konan-u.ac.jp/html/545_ja.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------