

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2013～2014

課題番号：25560194

研究課題名(和文)マクロファージ機能修飾による再生治療新規アプローチへの挑戦

研究課題名(英文)Challenge in novel approach of regeneration therapy based on the functional modification of macrophages

研究代表者

田畑 泰彦(TABATA, Yasuhiko)

京都大学・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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ピオグリタゾンの局所徐放化によって、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果たしているマクロファージ(M₁)である慢性化M₁(M₁)に対する修復化M₂(M₂)の比率を高め、修復過程を促すことができた。マウス骨髄細胞をインターロイキン刺激することでM₁を調整した。このM₁をピオグリタゾン徐放化ハイドロゲルとともに培養したところ、修復化M₂(M₂)の機能マーカーであるアルギナーゼ分泌高まった。糖尿病マウスに皮膚欠損を作製、ピオグリタゾン徐放化ハイドロゲルを欠損部に投与、創傷治療を比較検討した。その結果、ハイドロゲル投与により欠損部でのM₂/M₁比の増加と修飾促進が認められた。

研究成果の概要(英文)：Macrophages (M₁) play an important role in the biological switching between chronic inflammation and tissue repair healing. Local release of pioglitazone enhanced the ratio of healing M₂ (M₂) to inflammatory M₁ (M₁), resulting a promoted healing process. M₁ were prepared through the interleukins stimulation of mouse bone marrow cells. When M₁ were incubated with hydrogels of pioglitazone release, the secretion of arginase as a marker of M₂ macrophages enhanced. After applied into the skin defect of diabetic mice, the hydrogels of pioglitazone release enhanced the M₂/M₁ ratio at the defect and promoted the wound healing of skin.

研究分野：再生医工学

キーワード：マクロファージ 細胞機能 ピオグリタゾン 徐放化 ハイドロゲル

1. 研究開始当初の背景

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な問題である。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、もしそれを修復過程へとスイッチングができれば、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。

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。薬によって修復化 M の比率を高め、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 の機能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、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スであることは疑いない。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 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、基礎生物学の研究ではあるが、薬により慢性化 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。

本研究で提案する技術、方法論がうまく機能した場合には、再生治療に有効で革新的な手段を与えることになる。治療修復への効率のよい移行が、再生修復に key となることは生物学的に予想されているにもかかわらず、それを積極的に再生治療に取り込む試みは国内外を通じて皆無であり、斬新な方法論を提供する。得られた研究成果は、細胞移植による再生治療効率をさらに向上させることは確実であり、炎症学と再生治療との間を埋める新しい学問分野の立ち上げと発展にも大きく貢献する。以上のように、本研究で期待通りの成果が得られた場合には、体内の炎症反応も反映した組織の再生修復を考えるというこれまでにない新しい概念による再生治療が実現する。その成果が再生治療に与える学術的、社会的な意義がきわめて大きいことは疑いない。

2. 研究の目的

創傷や病気は、必ず炎症反応をとらなう。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、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。幹細胞を活性化して用いるだけでなく、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。

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 の機能の修飾のための技術の開発である。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、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 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、皮膚、骨欠損モデルを用いて慢性化 M に対する修復化 M 比が与える幹細胞移植による組織再生修復効果を検討する。近年の M 生物学の進歩により、慢性化や修復化 M の役割が明らかとなっている。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。このような状況の中で、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 機能のスイッチングが可能となれば、治療修復が促進できるのではないかとこの着想に至った。

M 機能と慢性炎症との関連性についての基礎生物研究が行われている。しかしながら、薬を用いて M 機能のスイッチングを行い、治療修復を促進しようという研究報告は、国内外を通して皆無である。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。基礎生物学の進歩によって、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。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、再生治療と炎症学とをつなぐ新しい学問体系が構築され、M 機能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。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するためには、ゼラチンハイドロゲルの作製、ハイドロゲルからの M 機能修飾薬の徐放化、動物からの M の単離と培養、M の生物機能の評価、動物を用いた再生治療効果の評価などに対する実験手技、方法論が実施可能であることが必須である。本研究で行ったことは次の 4 つである。

- (1) M 機能を修飾する薬を徐放化する生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを作製、その生体吸収性と薬徐放性を制御する。
- (2) 得られた薬含有ハイドロゲルによる M 機能の修飾を *in vitro* 細胞培養法にて評価する。
- (3) 組織欠損モデル動物を用いた薬含有ハイドロゲルによる生体組織の再生治療効果の評価する。
- (4) 再生治療効果に与える M 機能の役割を評価する。M 修飾薬であるピオグリタゾンゼラチンハイドロゲルから徐放

化する。この徐放による慢性化 M (M1) と修復化 M との比率および M 機能を細胞培養と動物実験によって調べる。次に、動物モデルにより M 機能が組織の再生治療効果に与える影響を評価する。全ての研究成果をフィードバックしながら、M 機能修飾薬徐放化ハイドロゲルを利用した、マクロファージ機能の修飾を介した再生治療技術の開発を達成する。

4. 研究成果

本研究では、薬として細胞内 peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) 活性を高める難水溶性のピオグリタゾンを用いた。ポリ乳酸を化学導入したゼラチンの疎水性誘導と混合ミセル複合化することでピオグリタゾンを水可溶化した。水可溶化ピオグリタゾンミセルをゼラチン水溶液に混合、凍結乾燥した。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、水可溶化ピオグリタゾンミセル含有ハイドロゲルを作製した。マウス骨髄細胞をインターロイキン刺激することで M を調製した。この M を水可溶化ピオグリタゾンミセル含有ハイドロゲルとともに培養した。修復化 M (M2) と慢性化 M (M1) をそれぞれの機能マーカーであるアルギナーゼ分泌、および一酸化窒素(NO)産生で評価したところ、水可溶化ピオグリタゾンミセル含有ハイドロゲルによりアルギナーゼ分泌が高まった。糖尿病マウスに皮膚欠損を作製、ピオグリタゾン含有ハイドロゲルおよび遊離ピオグリタゾンを欠損部に投与、創傷治療を比較検討した。その結果、ピオグリタゾン含有ハイドロゲル投与により欠損部での M2/M1 比の増加と修飾促進が認められた。

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 2 件)

Murakami M, Saito T, Tabata Y. Controlled release of sphingosine-1-phosphate agonist with gelatin hydrogels for macrophage recruitment. *Acta Biomater.* 10(11). 2014. 4723-4729
DOI: 10.1016/j.actbio.2014.07.008.

Sato K, Sakai S, Kishi K, Tabata Y. Controlled release of pioglitazone from bio-degradable hydrogels to modify macrophages phenotype. *Inflammation and Regeneration.* Vol.35 No.2. 2014. 086-096
<http://www.jsir.gr.jp/journal/Vol35No2/3502.html>

〔学会発表〕(計8件)

金亮希、田畑 泰彦、Enhancement of bone regeneration by controlled release of bone morphogenetic protein-2 and a macrophage recruitment agent from gelatin hydrogel、KIPS 若手高分子シンポジウム、2014.12.12 京都

金亮希、田畑 泰彦、Controlled release of a macrophages recruitment agent and bone morphogenetic protein-2 from gelatin hydrogels、第36回日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-18 東京

Kim Y.H., Tabata Y. Enhancing macrophage recruitment by controlling scaffold pore size. BioMedical Engineering Society Annual Meeting. 2014.10.22-25 San Antonio, USA

Kim Y.H., Tabata Y. Enhancement of wound healing by dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophages recruitment agent from gelatin hydrogel. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society-Asia Pacific. 2014.9.24-27, Daegu, Korea

金亮希、田畑 泰彦、Enhancement of dual release of stromal derived factor-1 and a macrophage recruitment agent on tissue regeneration、第9回関西若手研究発表会、2014.8.5 京都

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. 第21回 BMP 研究会. 2014.7-27 大阪

金亮希、田畑 泰彦、Effect of macrophages and MSC recruitment by dual release of a macrophage recruitment agent and stromal cell-derived factor-1 from gelatin hydrogel、第35回日本炎症・再生医学会、2014.7.1-4 沖縄

Kim Y.H, Tabata Y. Synergistic effects of dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophages recruitment agent from gelatin hydrogel on wound healing 「Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society-Europ. 2014.6.10-13, Genova, Italy

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50211371

(2) 研究分担者

山本 雅也 (YAMAMOTO, Masaya)
京都大学・再生医科学研究所・准教授
研究者番号：10332735

(3) 連携研究者

()

研究者番号：