

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560218

研究課題名(和文)人工材料に対する免疫・炎症反応の網羅的遺伝子発現解析によるin vivo評価

研究課題名(英文)In vivo evaluation of immune responses and inflammation against biomaterials by global gene analysis

研究代表者

柿木 佐知朗(Kakinoki, Sachiro)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：70421419

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)：人工臓器や歯科用インプラントなどの医療デバイスは、臨床で広く用いられている。これら人工物を生体に埋入すると異物反応が引き起こされるが、その機構は明らかになっていない。本研究では、バイオイナートポリマーとして知られるMPC(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)ポリマーをコートした多孔質ポリエチレンをマウス背部皮下に埋入し、内部に浸潤した細胞の遺伝情報を網羅的に解析することによって、生体反応を詳細に解析した。その結果、MPCポリマーによる初期炎症の強い抑制ならび遅延効果を、炎症関連遺伝子の発現傾向から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently, medical devices such as artificial organs and prosthetic implants are widely used for clinical practices. When these artificial materials are implanted into living body, the foreign body reactions are induced. The foreign body reactions against device implantation is different them against virus infection, and their biological mechanism have not been clarified yet. In this study, we analyzed the host responses against porous polyethylene scaffolds coated with MPC polymer, which is widely used as bioinert polymer, in the gene level. The results of gene level analyses suggested that the initial inflammation is strongly inhibited and delayed by MPC polymer coating.

研究分野：バイオマテリアル、タンパク質化学、ペプチド化学

キーワード：バイオマテリアル 炎症 免疫反応 バイオイナート MPCポリマー 多孔質体 細胞浸潤 遺伝子  
網羅解析

### 1. 研究開始当初の背景

人工心臓や人工関節、人工肺、人工透析などの人工臓器、人工血管、ステントや歯科用インプラントなどの医療用デバイスは、高齢化社会の煽りと先端医療の発展を受け、幅広い疾患の治療に用いられている。また、平成23年度から27年度までの5年間を対象とした第4期科学技術基本計画(平成23年8月19日閣議決定)にも「ライフイノベーションの推進」が挙げられており、今後、益々その需要は増大するものと考えられる。このような状況にあるにもかかわらず、30年以上も前より変わらずポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレン、ポリメチルメタクリレート、ステンレス、チタン合金などが、今もなお医療用デバイスの構成材料として用いられている。これら材料に対する生体反応が未解明なまま使用され続けていることは大きな問題である。実際に、生体適合性材料であっても、組織や血液と接触して数分～数時間程度の短期間では癒着や血栓形成を抑制するが、数日以上長期埋入時には慢性炎症など致命的な合併症を引起すことがある。つまり、生体適合性材料であっても生体は異物として認識し、免疫によってそれを排除しようとする。人工材料に対する免疫は、微生物やウイルスと同じ異物認識と同じ階層的炎症性免疫反応として解釈されてきたが、言うまでもなく人工材料は貪食や分解されない特殊な異物であるため、それに対する免疫反応も特殊であることが推測される。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに誰も成し得ていない人工材料に対する炎症・免疫反応の機構解明を、*in vivo* 評価系における遺伝子網羅解析によって試みる。研究期間内に、人工材料に対する炎症・免疫反応の遺伝子網羅解析手法の確立と、得られた遺伝情報の体系化を目指す。本研究で得られる人工材料の移植が引き起こす免疫応答に関係した膨大な遺伝情報から特徴的なものを抽出することで、目的とする機構解明の糸口を探る。本研究の成果は、特定遺伝子の発現量を定量することによって人工材料の生体安全性を評価する新たな方法論や、特定遺伝子の発現を制御することで目的の生体反応(組織再生や抗炎症など)を誘導するような新しい機能性人工材料の設計手法の提唱に繋がることを期待され、学術的・臨床応用的な意義は極めて大きい。

### 3. 研究の方法

本研究では、特徴的な遺伝子発現パターンを示すと思われるパイオニートなポリマーに対する生体反応をターゲットとした。

- MPCポリマーコート多孔質体の作製  
人工臓器や人工関節のコーティング剤

として臨床にも広く用いられているMPC(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)ポリマーをコートしたタブレット状の多孔質ポリエチレンを作製した。Poly(MPC-co-n-ブチルメタクリレート(BMA))(MPC/nBMA = 30/70 mol%/mol%)の0.2 wt% エタノール溶液を多孔質ポリエチレン(Sunfine®AQ-900; 旭化成ケミカルズ株式会社)(孔径30 $\mu$ m、 $\phi$ 6 mm、厚さ2 mm)に滴下・乾燥することで、ポリマーをコーティングした。ポリマーのコーティングは、エネルギー分散型X線分析(EDX)(JSM-6390LM、日本電子株式会社)での表面元素分析によって確認した。

#### ■ MPCポリマーコート多孔質体の移植

麻酔下でICRマウス(6週齢、オス)の背部中央部の皮下にポケットを作製し、そこにあらかじめ生理食塩水に1時間浸漬させた未コートもしくはMPCポリマーコート多孔質体を埋入した。マウス1匹あたり1個多孔質体を、それぞれ同じ箇所に移植した。本研究における全ての動物実験は、国立循環器病研究センター研究所に設置された動物実験委員会の承認を得て、関係法令等を遵守して遂行した。

#### ■ 多孔質体への細胞浸潤挙動の評価

移植7日および28日後に、マウスを犠牲死させて移植した多孔質体を、周辺組織を含めて回収した。断面の組織切片を作製し、HE染色によって周辺繊維組織の形成と細胞の浸潤挙動を組織学的に評価した。

#### ■ 多孔質体に浸潤した細胞の遺伝子解析

多孔質体内部に浸潤した細胞から total RNA を抽出した。それを用いて、CCR7(M1(炎症性)マクロファージのマーカー遺伝子)およびCD206(M2(抗炎症性)マクロファージのマーカー遺伝子)の発現量を定量した。同 total RNA を用いて、マウス全ゲノムを搭載したマイクロアレイ(Agilent Technologies)を用いて遺伝子発現プロファイルを数値化し、Panther(<http://www.pantherdb.org>)データベースを用いて解析した。さらに、炎症関連サイトカイン類の発現量をサイトカインPCRアレイ(Mouse Inflammatory Cytokine and Receptor RT2 Profiler PCR Array; QIAGEN)を用いて定量した。

### 4. 研究成果

#### ■ MPCポリマーコート多孔質体の形態と表面観察

多孔質体に対する生体反応は、その孔径や空隙率に大きく依存することが報告されている。そのため、まずMPCポリマーコーティング前後の多孔質体の断面を走査型電子

顕微鏡で観察した。いずれも孔径等に変化は見られなかったことから、本研究の評価系はMPCポリマーコートの効果のみを解析する適切な方法と考えられる。EDXによる表面元素分析で多孔質体の表層および内部にリンのピークが検出されたことから、多孔質体全面にMPCポリマーがコーティングされていることも確認した。

■ MPCポリマーコート多孔質体への組織反応

移植7日および28日後に多孔質体を取り出し、HE染色によって組織学的に周辺組織の反応と内部への組織浸潤を観察した。その結果、MPCポリマーをコートすることで、いずれも周辺組織の線維化や内部への細胞浸潤が強く抑制されており、MPCポリマーによるバイオイナートな特性が示された。

■ MPCポリマーコート多孔質体内部に浸潤したマクロファージのフェノタイプ解析

内部に浸潤した細胞からtotal RNAを抽出し、M1およびM2マクロファージのマーカー遺伝子の発現をリアルタイムPCRで定量した。MPCポリマーをコートすることで7日後のM1マクロファージ発現量は有意に減少し、28日後は未コートよりも僅かに高くなる傾向があった。MPCポリマーの有無に関係なく、遺伝子発現量は7日後と比較して28日後に大きく低下していたことから、炎症反応は終息に向かっていると考えられる。M2マクロファージのマーカー遺伝子の発現量は、7日後は同程度であったが、28日後はMPCコートの方が未コートよりも高くなった。これらは、28日後に炎症反応が未コートでは完全に終焉しているのに対し、MPCコートでは弱い炎症反応が継続していることを示唆している。

■ MPCポリマーコート多孔質体内部に浸潤した細胞の遺伝子網羅解析

浸潤細胞のマウス全ゲノムが搭載マイクロアレイによる網羅解析の結果、3744遺伝子の発現データを得た。それらをデータベースでクラスタリング解析したところ、MPCポリマーをコートすることで刺激応答(response to stimulus)に関係する遺伝子(279遺伝子)の多くは、その発現が7日後は抑制され、28日後は未コートよりも高くなることが分かった。アポトーシス関連遺伝子の発現レベルに変動は見られなかったことから、多孔質体やMPCポリマーによって細胞・組織毒性は示さない示唆された。

■ MPCポリマーコート多孔質体への組織反応

続いて多孔質体内部での炎症反応を評価するために、炎症性サイトカイン類関連遺伝子の発現量をPCRアレイによって定量し

た。その結果、MPCコートによって炎症性ケモカイン類(Cxcl9, Cxcl10, Cxcl13, Ccl7, Ccl11, Ccl12, Ccl19など)の発現が7日後は強く抑制され、28日後にはすることが分かった。

これらの結果から、MPCポリマーのバイオイナート特性が炎症の抑制によることが遺伝子レベルで明らかとなった。また、MPCポリマーでも、長期移植によって弱い炎症反応が惹起されることも分かった。

本研究の方法は、バイオマテリアルが惹起する特殊な異物・炎症反応の遺伝子レベルでの解析を可能とし、臨床に用いられているバイオマテリアルの真の生体安全性を評価するための強力なツールとなることが示唆された。

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 1件)

1. Sachiro Kakinoki, Yusuke Sakai, Taro Takemura, Nobutaka Hanagata, Toshia Fujisato, Kazuhiko Ishihara, Tetsuji Yamaoka, Gene chip/PCR-array analysis of tissue response to 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer surfaces in a mouse subcutaneous transplantation system, *J. Biomat. Sci., Polym. Ed.*, 25 (14-15), 1658-1672 (2014) [査読あり]

[学会発表](計 2件)

1. Yusuke Sakai, Sachiro Kakinoki, Taro Takemura, Nobutaka Hanagata, Toshia Fujisato, Kazuhiko Ishihara, Tetsuji Yamaoka, Analysis of in vivo inflammatory responses to polyethylene porous scaffolds, 第62回高分子学会年次大会(京都、2013年5月31日)
2. 柿木佐知朗、坂井勇亮、竹村太郎、花方信孝、藤里俊哉、石原一彦、山岡哲二、MPCポリマー修飾表面が誘起する炎症関連遺伝子発現の変動、第36回日本バイオマテリアル学会大会(船堀、2014年11月18日)

[図書](計 0件)

該当なし

[産業財産権]

該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

柿木 佐知朗 (KAKINOKI, Sachiro)

( 国立循環器病研究センター研究所 生体  
医工学部 )

研究者番号 : 70421419

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし