

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05040

研究課題名(和文) サブセット制御による組織修復型マクロファージの大量増幅と組織再生療法への応用

研究課題名(英文) Large scale amplification of tissue-repairing macrophages by regulation of subset differentiation and their application for tissue regeneration.

研究代表者

星 和人 (Hoshi, Kazuto)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30344451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマクロファージと呼ばれる細胞を用いた創傷治療法の原理を確立することを目的に検討を行った。マクロファージの状態を蛍光で検出できるマウスを作製し、背部の皮膚を一部欠損させて、創傷が治癒する過程を顕微鏡を用いて観察した。また、マウスの血液から創傷治癒を促進する働きを持つマクロファージを増殖させる方法や、その効果について検討した。さらに、マウス体内で軟骨が再生する過程におけるマクロファージの働きについても、非常に小さな構造が観察可能な電子顕微鏡などを用いて検討した結果、軟骨再生の早期においてマクロファージが軟骨細胞に直接作用していることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research was performed to establish the principle of the treatment for the wound by using cells called macrophage. Mice in which the state of macrophage can be detected by fluorescence were generated. Skin defects were made on the back of the mice, and the process of the wound healing was observed by microscopy. Methods to increase the macrophages, which can promote the wound healing, from the blood, and the potency of the macrophages were examined. In addition, the role of macrophages during the cartilage regeneration in the body was examined using several methods including electron microscopy by which minute structures can be observed. As a result, it was strongly suggested that macrophages affect chondrocytes directly in the early phase of the cartilage regeneration.

研究分野：再生医療、口腔外科学

キーワード：マクロファージ 組織再生

## 1. 研究開始当初の背景

顎・顔面は、皮膚や粘膜、骨、軟骨など多くの組織が限られた領域の中で密接に結合し、非常に複雑で、高度に機能化した構造を有している。外傷や悪性腫瘍の切除、炎症性疾患などにより損傷を受けた場合には、たとえ四肢や体幹に比べ損傷範囲が小さくても、非常に複雑な組織再建術が必要となる。高齢社会の進展により、口腔外科領域におけるこのような患者の数は益々増加すると予想される。しかし、血管柄付き組織移植など侵襲の大きな再建術が選択されることも少なくなく、高齢者にとっては多大な負担となる。そのため、新しい組織修復・再生法の開発は現代社会の喫緊の課題となっている。組織再生法の開発においては、投与する細胞、足場素材、成長因子の研究が主幹となる再生医療が盛んに研究されている。われわれも世界に先駆けて 3 次元再生皮下軟骨を開発し、現在口唇口蓋裂の患者に使用して良好な成績を得ている[Hoshi, Oral Sci Int 2013]。一方、移植した再生組織に対する移植母床の反応は、再生組織の生体内での生着や成熟に大きな影響を及ぼすため、移植母床の反応や組織修復に対する作用を詳細に解析することは、細胞・素材・因子の研究に匹敵するほど重要であると考えられる。移植母床の反応や組織修復に対する作用を研究する上で、最も単純なモデルは創傷治癒である。創傷治癒においてはマクロファージの重要性が古くから指摘されているが、近年、マクロファージ分化に関する知見が集積し、分化特性の異なるマクロファージ(サブセット)の存在が指摘されるようになった。マクロファージは主に *in vitro* の知見から、TNF- $\alpha$  や IL-1 など炎症性サイトカインを分泌する炎症促進型サブセット(M1)と、IL-10 など抗炎症性サイトカインの分泌を介して創傷の治癒に貢献する組織修復型サブセット(M2)に大別されることが明らかとなった[Mosser, Nat Rev Immunol 2008]。創傷治癒においても、出血凝固期、炎症期、増殖期を経て、形成期へと進行することに伴い M1 サブセット優位から M2 優位へと移行すると推察される。しかし、*in vivo* での確固たる根拠は確立されておらず、創傷部周囲における単球から M1 ならびに M2 への詳細な分化機構はもとより、M1/M2 相互作用や相互分化転換も実証されていない。生体内の創傷修復における M1/M2 サブセットの動態を詳細に解析することは、創傷治癒過程の根本的理解に必須であると考えられる。

## 2. 研究の目的

創傷修復の主体をなすマクロファージのサブセット、特に形成期のサブセット動態を *in vivo* で詳細に解析し、組織形成を促進する組織形成性サブセットを同定することによ

り、口腔外科のあらゆる治療に繋がる創傷治癒過程の根本的理解に道を拓くことである。この知見を元に、末梢血を由来とする組織形成性サブセットの大量増幅法を開発し、大量増幅した組織形成性サブセットを創傷部に投与することにより、一般の採血のみで実現する新規な組織修復・再生医療法を原理的に確立することである。

## 3. 研究の方法

### 1) 2 光子励起顕微鏡によるマウス組織修復観察系の確立

C57BL6 マウス背部に径 1cm の皮膚欠損を作製し、2 光子励起顕微鏡を用いて欠損部を観察する。第 2 次高調波発生を用いたコラーゲンの無染色での検出によりなどにより修復を評価し、マウス組織修復観察系を確立する。

### 2) 全マクロファージおよび M1/M2 サブセットマクロファージを特異的に標識する遺伝子改変マウスの作製

マクロファージを特異的に検出し、かつ過去に M1 サブセット(以下 M1)に分化したことを刻印するため、LysM プロモーター下流に、2 つの LoxP 配列に挟まれた緑色蛍光タンパク質 GFP と polyA 配列(ストップ配列)、さらに下流に青色蛍光タンパク質 CFP を持つ DNA コンストラクト(#1)を作製する。同様に、M1 特異的な iNOS プロモーター下流に CFP を持つコンストラクト(#2)を、M2 サブセット(以下 M2)特異的な Arginase 1 プロモーター下流に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を持つコンストラクト(#3)、M1 特異的な iNOS プロモーターの下流に Cre を有するコンストラクト(#4)を作製する。

#1~4 を導入した遺伝子改変マウスを計 4 系統作製する。さらに、#1、#2、#3 導入マウスを交配し、マクロファージ全体が GFP で、M1 が CFP、M2 が tdTomato で標識されるマウス(サブセットマウス)を作製する。また、#1、#3、#4 導入マウスを交配し、マクロファージ全体が GFP で、M1 に分化した履歴のある細胞が CFP で、M2 が tdTomato で標識されるマウス(M1 刻印マウス)を作製する。

### 3) マウス組織修復過程の解析

2)項で作製したマウスを用いて、1)項で検討した組織修復モデルを作製し、イメージングなどの解析を行い、得られた所見を基に、組織修復に貢献する組織形成性サブセットマクロファージを検索する。

### 4) 組織形成性サブセットマクロファージの大量増幅法の確立

C57BL6/J マウス末梢血より Ficoll-Paque を用いて単核球を分離し、M-CSF、インスリンヒアルロン酸などの存在下で培養することで、組織形成性サブセットマクロファージの大量増幅を試みる。dectin-1 (-)/VEGF(+)を

示す M2d とされる組織形成性サブセットマクロファージの全マクロファージ中に占める割合の変化をフローサイトメトリーで計測する。

5) 組織形成性サブセットマクロファージの皮膚創傷治癒に与える影響の検討

4) で確立した方法を用いて、マウス皮膚欠損モデルにおける組織形成性サブセットマクロファージの創傷治癒促進効果について検討する。

#### 4. 研究成果

平成 27 年度は、全マクロファージ及び M1/M2 サブセットマクロファージを特異的に標識する遺伝子改変マウスを作製した。当初は、マクロファージを特異的に検出し、かつ過去に M1 サブセットマクロファージに分化したことを刻印するため、LysM プロモーターの下流に、2 つの LoxP 配列に挟まれた緑色蛍光タンパク質 GFP と polyA 配列(ストップ配列)、さらに下流に青色蛍光タンパク質 CFP を持つ DNA コンストラクト(a)、M1 サブセットマクロファージを検出するため、iNOS プロモーターの渦中に CFP を持つコンストラクト(b)、M2 サブセットマクロファージを検出するため、Arginase 1 プロモーターの下流に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を持つコンストラクト(c)、M1 サブセットマクロファージ特異的に Cre リコンビナーゼを発現させるために iNOS プロモーターの下流に Cre を有するコンストラクト(d)を作製する予定であったが、かけ合わせの困難さなどを考慮し、再度設計を行った。結果として(a)と(c)を併せて cfms プロモーターの下流に 2 つの LoxP 配列に挟まれたストップ配列、さらに下流に GFP、Arginase 1 プロモーター、tdTomato の配列を持ったコンストラクト(pcfms-Ip-STOP-Ip-EGFP-pArg-Tmt) および(d)を作製し、それぞれを導入した遺伝子改変マウスを計 2 系統作製した。また、2 光子励起顕微鏡によるマウス組織修復観察系の確立のため、C57BL6 マウスの背部を剃毛し、ペントバルビタールナトリウム麻酔下に生検用パンチを用いて直径 5 mm の皮膚欠損を作製した。また皮膚欠損の長期観察を可能とするために背側皮膚チャンバーを導入し、マウスにおける組織秀句観察系の構築に向けた検討を行った。さらに、創傷治癒部の 2 光子観察の有用性を確認するために、組織修復後の皮膚切片を作製し、2 光子励起顕微鏡による観察を行った。コラーゲンの存在を示す第二次高調波発生シグナル強度は、創傷部の成熟度によって異なることが確認できた。

平成 28 年度は、これまでに得られた知見を基に、マウス末梢血から得られた単球分画に由来する組織形成性サブセットマクロファージの大量増幅法の確立を行った。C57BL6/J

の下大静脈から採血を行い、Ficoll-Paque を用いて単核球を分離した後、培養皿に播種し、M-CSF やインスリンを添加した培地で培養したのち、高濃度ヒアルロン酸存在下で培養することで、組織形成性サブセットマクロファージの大量増幅を試みた。フローサイトメトリーで計測したところ、dectin-1 (-)/VEGF(+)を示す細胞の割合が増加していた。これは創傷治癒性 M2 マクロファージの中でも、M2d とされる組織形成性サブセットマクロファージの特徴と合致した。また、マクロファージと脂肪組織由来間葉系幹細胞との共培養を行い、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の減少と抗炎症性サイトカイン IL-10 の増加を観察した。

平成 29 年度は、マウス皮膚欠損モデルを用いた皮膚創傷治癒の検討を、創傷部の収縮を防止するための工夫を加えつつ行った。これまでの脾細胞を用いた検討では、ヒアルロン酸存在下の培養により組織修復性 M2d マクロファージと考えられる細胞の割合が増加することで、ヒアルロン酸のみマクロファージ投与に比べ、創傷面積の減少が速い傾向にあり、また組織学的にも皮膚再生が良好な印象であったが、一方で血液中の単球より誘導できる M2d マクロファージの割合は脾細胞に比べ少なく、有効な創傷治癒のためにはさらなるプロトコルの改良が必要と考えられた。この皮膚創傷治癒の検討に加え、軟骨再生に対しての組織修復性マクロファージの応用についても検討するため、まず軟骨細胞移植時の宿主側マクロファージの動態について併せて検討した。マクロファージはカバースリップに播種した軟骨細胞を移植後早期に増加し、また電子顕微鏡を用いた検討では、軟骨細胞との細胞間接着と考えられる像が見られた。これらの所見からは、移植早期においてマクロファージが軟骨細胞に直接作用し、軟骨組織再生においても何らかの形で関与していることが強く示唆された。

#### 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)

Electron microscopic observation of human auricular chondrocytes transplanted into peritoneal cavity of nude mice for cartilage regeneration.  
Yamawaki T, Fujihara Y, Harata M, Takato T, Hikita A, Hoshi K.  
Regenerative Therapy 2018 June 8; 1-8.  
Epub 2017 December 15

〔学会発表〕(計 1 件)

軟骨細胞の再分化過程に関連する生体内因

子についての検討

山脇 孝徳、藤原 夕子、疋田 温彦、高戸 毅、  
星 和人

第 17 回日本再生医療学会総会 2018 年 3 月  
23 日 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

星 和人 (Kazuto HOSHI )  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：30344451

### (2)研究分担者

藤原 夕子 (Yuko FUJIHARA )  
東京大学・医学部附属病院・特任講師  
研究者番号：50466744

疋田 温彦 (Atsuhiko HIKITA )  
東京大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号：60443397

高戸 毅 (Tsuyoshi TAKATO )  
東京大学・医学部附属病院・登録診療員  
研究者番号：90171454

稲木 涼子 (Ryoko INAKI )  
東京大学・医学部附属病院・特任研究員  
研究者番号：90632456