

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14099

研究課題名(和文) ナノバイオ界面機能を制御する疎水化微粒子を用いた創傷治癒促進材料の開発

研究課題名(英文) Development of wound dressing of hydrophobized colloids by controlling nano-bio interface functions

研究代表者

西口 昭広 (NISHIGUCHI, Akihiro)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・研究員

研究者番号：10784944

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)：本研究では、材料と組織のナノバイオ界面における生体応答の制御を可能とする疎水化微粒子からなる創傷治癒促進材料の開発を目指す。乾式噴霧によって創部へ送達された疎水化微粒子は、浸出液によって速やかに膨潤、接着することで組織界面を保護し、さらに、種々の細胞と積極的に相互作用することで生体応答を制御する。本粒子を用いて、生体材料による治癒メカニズムを解明することで、組織再生を促進する革新的な創傷被覆材の開発が可能になると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来の創傷被覆材のように単に外部刺激から保護するだけでなく、疎水化微粒子型被覆材がナノバイオ界面で生体組織に積極的に相互作用することで、接着性・止血作用・多細胞シグナリング・血管新生・再上皮化などの生体応答を制御し、組織治癒を促進する点が特徴的である。本材料は、ESD後の創傷治癒のみならず、熱傷や褥瘡、糖尿病性潰瘍などの皮膚欠損の治療や、消化管穿孔の閉鎖、消化管潰瘍への適用、虚血性疾患治療など様々な応用展開が可能であり、国内の医療器機産業の発展に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop colloidal wound dressing with tissue adhesive properties which promote tissue regeneration. This colloid can be delivered by dry spraying and adhere to wound area to protect from external stimuli. Moreover, this particle can interact with various cells and control cellular responses. By understanding the mechanism on tissue regeneration, an innovative wound dressing can be developed.

研究分野：生体材料工学

キーワード：創傷治癒 組織接着 微粒子 ゼラチン 生体高分子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本人のがんによる死亡者数が年間 30 万人を超え、3 人に 1 人ががんで亡くなっている中で、がんに対する低侵襲な治療法の開発が強く求められている。内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) は、食道や胃、大腸などの粘膜層に発生した早期がんを内視鏡によって切除する非常に低侵襲な治療法であり、大きな注目を集めている。一方で、がん組織の切除後、切除部位の収縮 (癒痕拘縮) や出血、炎症が深刻な問題となり、食道がんに対する ESD 後においては患者の 80% 以上において狭窄が起きることが報告されている (A. Ido et al., *Medicine*, 94, e373 (2015))。このような縫合が困難な臓器内部の創傷の閉鎖に対しては、創傷部位を乾燥や物理刺激、細菌感染などから保護できる創傷被覆材が適用されることが望ましい。創傷治癒は、血液凝固因子による「血液凝固期」、免疫細胞による食食や炎症シグナルが起きる「炎症期」、線維芽細胞の動員と血管新生、上皮層の形成が起きる「増殖・組織再構築期」に分類され、創傷被覆材はこれらのプロセスをサポートする必要がある。しかしながら、従来高分子系創傷被覆材は、非吸収性材料であるため臓器への適用は難しく、組織に対する接着性が低いため剥離してしまう点、材料の分解に伴う炎症が生じる点、創傷部への送達が難しい点などの課題があった。組織の自己治癒を促進可能な被覆材を新たに設計するためには、材料—組織のナノバイオ界面における物理的・生物学的相互作用が、組織治癒プロセスにどのように影響するかを理解することが重要であるが、その機序は未だ解明されていない。

### 2. 研究の目的

本提案では、材料と組織のナノバイオ界面における生体応答の制御を可能とする微粒子型創傷治癒促進材料の開発を目指した。創傷治癒における血液凝固期、炎症期、増殖・組織再構築期の各プロセスを材料によって制御できれば、ESD 後の創傷治癒を促進する材料として有用であると考えた。本研究では、疎水化ゼラチンをスプレードライ法によって粒子化し、熱架橋することで疎水化マイクロ粒子 (hydrophobized microparticles, hMPs) を調製し、創傷被覆材としての機能について検証を行った (図 1)。コロイドの設計においては、一般的に、水中での分散性を高めるためには親水化処理を行うことが重要であるが、生体分子との相互作用を誘導するには、むしろ疎水化することが重要であると考えた。疎水性相互作用を基にして、細胞や細胞外マトリックスなどの生体成分との物理的・生物学的相互作用が可能な疎水化微粒子は、組織治癒の促進に必要な種々の生体応答を誘導し、治癒メカニズムの解明につながると考えられる。本粒子を創傷被覆材として創部へ使用することで、創傷治癒を促進し、合併症を予防することができる。と期待される。

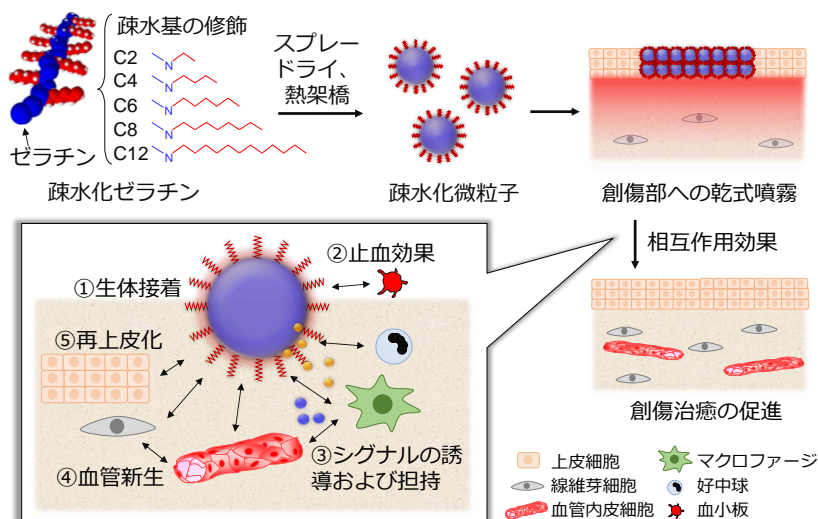


図 1. 本研究で創出する疎水化微粒子のイメージ

### 3. 研究の方法

本研究では、①疎水化微粒子の調製と評価、②生体組織に対する物理的・生物学的な相互作用解析 (in vitro, ex vivo)、③創傷治癒促進材として機能評価 (in vivo) を行うことで、微粒子型創傷治癒促進材料の開発を進めた。

#### ① 疎水化微粒子の調製と評価

生体応答が制御可能な微粒子型創傷治癒促進材料として、疎水化度や粒径 (ナノ・マイクロ)、膨潤度、分解性などが制御された疎水化微粒子を調製する。生体由来高分子であるゼラチンに対して、疎水基である脂肪族アルデヒドを還元的アミノ化反応によって分子修飾する。ブタゼラチン (Mw = 100 kDa) に対して、2-ピコリンボラン存在中で、異なるアルキル鎖長を有する脂肪族アルデヒド (C2、C4、C6、C8、C12) を導入することで、疎水化ゼラチンを合成した。微粒子の

調製法としてスプレードライ法を用い、150°Cで1~6時間の熱架橋処理を行うことで、疎水化微粒子を作製した。走査型電子顕微鏡 (SEM) によって粒径や形態を評価した。また、粒子の表面構造を解析するために、接触角測定を行い疎水化度を評価した。

② 生体組織に対する物理的・生物学的な相互作用解析 (in vitro, ex vivo)

得られた hMPs の組織接着性を評価した。ESD 後の創傷被覆を想定して、ブタ胃粘膜下層組織を用いた (図 3a)。ブタ胃の粘膜を切除し、露出した粘膜下層組織に対して、炭素鎖長または導入率の異なる種々の hMPs を塗布し、80 kPa で3分間圧着後に、引張試験によって接着強度評価した (ASTM F-2258-05)。また、粒子の止血効果に関しては、ラット全血を用いて、血液凝固時間を評価した。また、疎水化微粒子と免疫細胞や線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞との生体応答に関しては、ヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞を用いた細胞増殖試験およびマクロファージ様細胞 (RA264 細胞) を用いた ELISA アッセイを行った。これらの試験によって、粒子が細胞機能に与える影響や創傷治癒過程に関わる増殖因子や炎症シグナリングの発現量に与える影響を評価した。これより、血管新生や炎症反応、線維化の亢進・抑制などの細胞シグナリングに対する疎水化粒子の役割を明らかにし、治癒を促進する微粒子に求められる特性を見出した。

③ 創傷治癒促進材として機能評価 (in vivo)

創傷治癒過程の評価に関しては、ラットを用いた動物実験を用いて行った。ラットの皮膚全層欠損モデルを作製し、鎖長の異なる疎水基を導入した疎水化粒子を乾式噴霧し、治癒過程を観察する。組織学的評価 (免疫染色) と in vivo 蛍光イメージングによって組織構造を観察し、材料の分解速度や治癒速度、炎症反応、線維化、血管新生等について、粒子の構造特性との相関を評価した。

4. 研究成果

ブタゼラチンに対して、還元的アミノ化反応を用いることで脂肪族アルデヒド (疎水基) を導入した。疎水基の導入率については、TNBS 法を用いて評価した。得られた疎水化ゼラチンを用いて、スプレードライ法によって疎水化ゼラチン粒子を作製した。さらに、熱架橋を行うことによって、粒子を不溶化し、水中での安定性を向上させた。3時間以上熱架橋を行うことによって、安定性が向上することが分かった。SEM 観察の結果より、得られた hMPs は直径が約 1-5 μm 程度であり、球状の形態であることが分かった (図 2a)。また、水接触角試験の結果より、ゼラチンに導入する疎水基の鎖長に依存して、粒子の疎水性が制御できることが明らかとなった (図 2b)。本粒子は、粒子化後に熱処理を行っているため、導入した疎水基が粒子表面に偏析していると予想される。

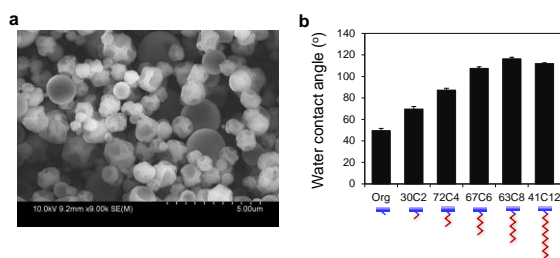


図 2. (a) 疎水化微粒子の SEM 画像と (b) 修飾する疎水基の鎖長と水接触角の関係

次に、hMPs の生体組織に対する接着性について評価を行った。ブタ胃から粘膜を除去し、粘膜下層組織に対する接着強度を引張試験を用いて評価した (図 3a)。図 3b のヘマトキシリン・

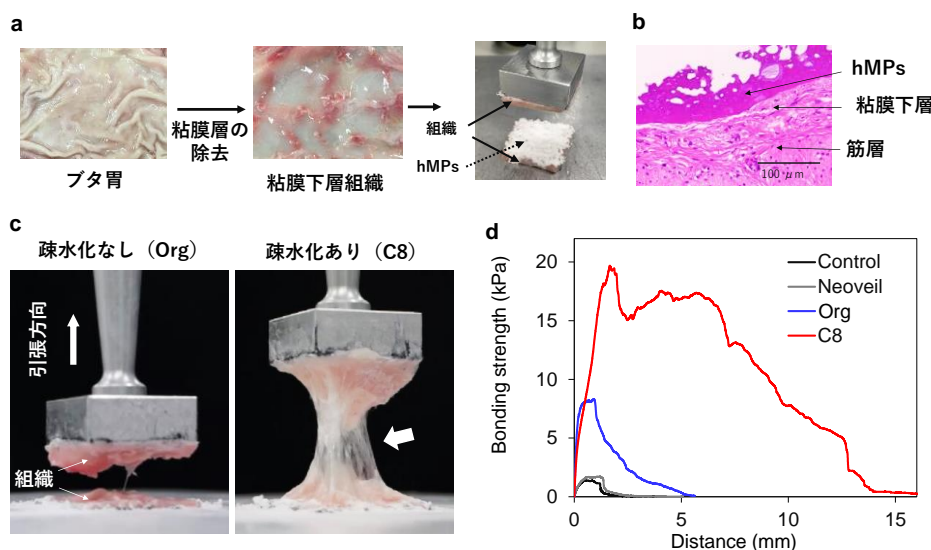


図 3. (a) ブタ粘膜下層組織を用いた接着試験の方法、(b) hMPs 塗布後の組織の HE 染色画像、(c, d) Org および C8 粒子のブタ粘膜下層組織に対する接着力評価



エオシン (HE) 染色をした組織切片画像に示すように、塗布した hMPs は粘膜下層阻止に接着し、また粒子同士が融合したフィルム状の構造を形成していた。組織接着試験において、疎水化処理をしていない粒子 (Original, Org) と比較して、オクタノイル基、C8 を導入した粒子 (C8) は組織に対して強く接着している様子が観察され、また粒子同士が融合したゲルフィルム状の構造も観察された (図 3c)。C8 粒子は、何も塗布しない場合や市販の組織補強材であるグリコール酸メッシュと比較して、約 10 倍の接着強度を示しており、また Org と比較して約 2 倍の高い接着強度を有していた (図 3d)。また、組織接着強度は、導入する疎水基の導入率と鎖長に大きく影響されることが明らかとなった。C8 を用いる場合には、より高導入率の hMPs が高い接着強度を示しており、また鎖長は C8 が最も高い接着強度を示した。C2 から C8 においては、疎水性の同大に伴う接着性の向上が見られたことから、疎水化による疎水性相互作用の誘起が接着の駆動力として重要であることが示唆されている。一方で、C12 を導入した hMPs においては、むしろ接着強度が低下した。これは、疎水化により水に対する親和性が著しく低下し、粒子が膨潤できなくなったためであると考えられた。そのため、組織接着性の向上に向けては、親-疎水バランスの精密な設計が必要であることが示唆された。これらの結果より、疎水化処理を行うことで、粒子表面に露出した疎水基が、湿潤環境下において、細胞や ECM 成分と疎水性相互作用によって強く相互作用することで界面接着が強固になり、また、疎水基同士の疎水性相互作用によって、粒子同士が強く凝集することでバルク強度が増大したと考えられる。本粒子は、組織上において、粒子同士が融合しゲル膜を形成するため、創部へ噴霧するだけで、粒子が融合した保護膜が形成され、創傷被覆材として機能すると期待される。

また、hMPs の生体成分との相互作用を評価するために、血液凝固試験と細胞増殖試験を行った。ラット全血と C8 粒子 (30 mg) を混合し、3 分間静置したところ、何も添加していない血液は凝固していなかったのに対して、粒子を添加することで血液凝固が促進された (図 4a)。また、鎖長の異なる hMPs の細胞接着および細胞増殖への影響について評価を行った。その結果、C4 および C6 を用いた hMPs において、未処理の Org 粒子と比較して、細胞接着および細胞増殖が促進されていることが明らかとなった (図 4b)。一方、C8 および C12 を用いた粒子では細胞増殖が低下していた。さらに、C12 においては、インターロイキン-1 (IL-1) や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が亢進されており、炎症反応を惹起することもわかった。これらの結果より、疎水化技術を用いて細胞との相互作用を制御することが可能であり、適切な疎水性を示す粒子を用いることで、細胞機能を制御できることが示唆された。

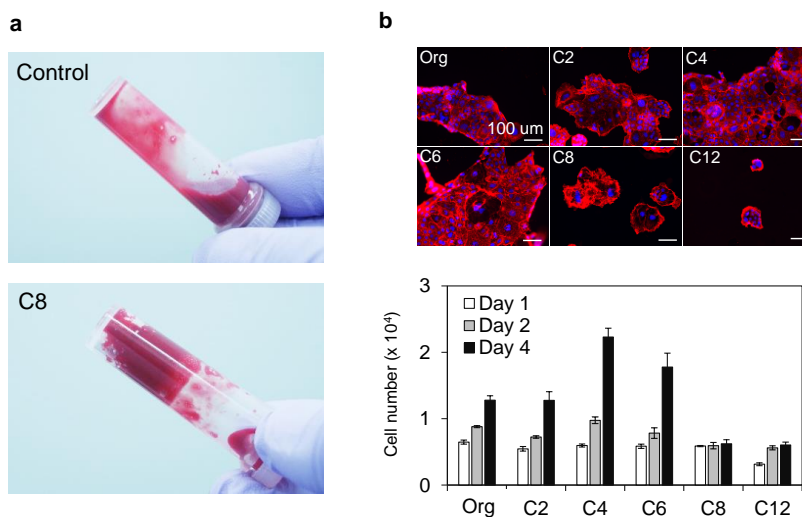


図 4. (a) ラット全血を用いた血液凝固試験、(b) hMPs からなるフィルム上で Caco-2 細胞を培養後のアクチン染色および細胞増殖試験

最後に、ラット全層皮膚欠損を用いて、hMPs が組織再生に与える影響について評価を行った。ラット背部に作製した全層皮膚欠損に対して、粒子を塗布し、組織切片観察を行うことで組織再生過程を観察した。図 5a のマッソン・トリクローム染色画像に示すように、未処理と C6 粒子処理のどちらの群においても、上皮化が認められた。しかしながら、未処理の組織においては、新生の線維芽組織が収縮している様子が確認された。一方で、粒子を塗布することで組織収縮は抑制されており、粒子が細胞足場として機能していることが示唆された。さらに、 $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) の染色画像からもわかるように、C6 粒子を塗布した真皮組織においては、 $\alpha$ -SMA の発現が有意に抑制されており、線維化が抑制されていることが示された (図 5b, c)。これらの結果より、hMPs は生体組織に強固に接着し、その創部を保護することで、炎症反応を低減し、

線維化を抑制したと考えられる。

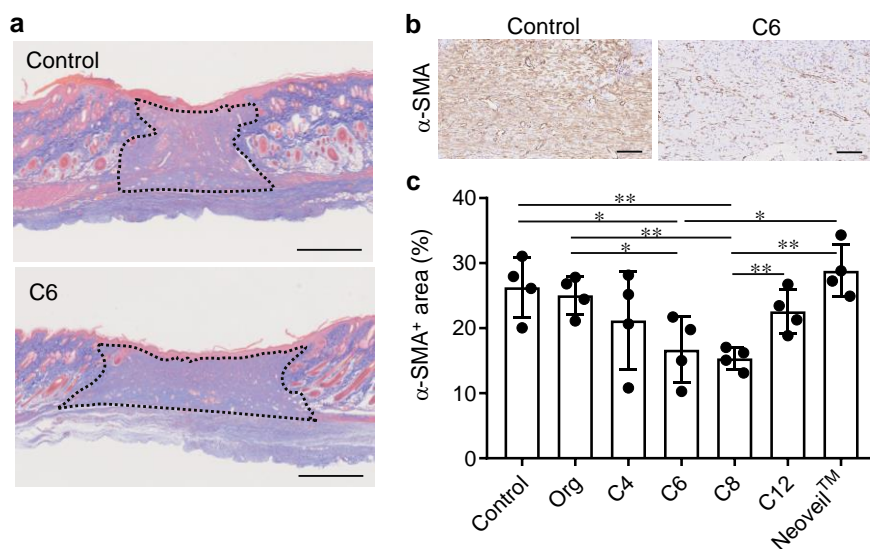


図 5. (a)ラット皮膚全層欠損モデルのマッソン・トリクローム画像 (Scale bar: 1mm)、(b, c)  $\alpha$ -SMA 染色画像 (Scale bar: 100  $\mu$ m) および陽性面積の定量結果 (\* $P$ <0.05、\*\* $P$ <0.01、 $n$ =4)

以上の結果より、分子構造を制御したバイオマテリアルである hMPs を用いることで、生体組織との接着や相互作用を制御し、組織再生を促進可能となることが示された。本材料を ESD 後の組織再生を目的として使用することで、ESD 後の狭窄や穿孔、後出血などの偶発症を予防することができると思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishiguchi Akihiro, Sasaki Fumisato, Maeda Hidehito, Kabayama Masayuki, Ido Akio, Taguchi Tetsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Multifunctional Hydrophobized Microparticles for Accelerated Wound Healing after Endoscopic Submucosal Dissection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 1901566 ~ 1901566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.201901566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiguchi Akihiro, Kurihara Yukari, Taguchi Tetsushi	4. 巻 99
2. 論文標題 Underwater-adhesive microparticle dressing composed of hydrophobically-modified Alaska pollock gelatin for gastrointestinal tract wound healing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 387 ~ 396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2019.08.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiguchi Akihiro, Taguchi Tetsushi	4. 巻 188
2. 論文標題 Designing an anti-inflammatory and tissue-adhesive colloidal dressing for wound treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 110737 ~ 110737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2019.110737	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiguchi Akihiro, Kurihara Yukari, Taguchi Tetsushi	4. 巻 3
2. 論文標題 Hemostatic, Tissue-Adhesive Colloidal Wound Dressing Functionalized by UV Irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 1705 ~ 1711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbam.0c00015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 西口昭広, 佐々木文郷, 前田英仁, 樺山 雅之, 井戸章雄, 田口哲志
2. 発表標題 消化管がん術後の線維化を抑制する接着性創傷被覆粒子の創出
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西口昭広, 佐々木文郷, 前田英仁, 樺山雅之, 井戸章雄, 田口哲志
2. 発表標題 消化管がん術後の組織再生を促進する接着性創傷被覆粒子の開発
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Nishiguchi, F. Sasaki, H. Maeda, M. Kabayama, A. Ido, T. Taguchi
2. 発表標題 Tissue-adhesive colloidal wound dressing for gastrointestinal cancer, A. Nishiguchi
3. 学会等名 ABMC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西口昭広, 佐々木文郷, 前田英仁, 樺山雅之, 井戸章雄, 田口哲志
2. 発表標題 消化管がん術後の組織再生を制御する接着性創傷被覆粒子の開発
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Nishiguchi, F. Sasaki, H. Maeda, M. Kabayama, A. Ido, T. Taguchi
2. 発表標題 Development of sprayable, tissue-adhesive colloidal wound dressing for gastrointestinal cancer therapy
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西口昭広、田口哲志
2. 発表標題 疎水化ゼラチン粒子からなる噴霧型創傷被覆材の開発
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西口昭広、田口哲志
2. 発表標題 消化器ガン治療後に用いる組織接着性創傷被覆粒子の開発
3. 学会等名 第56回日本接着学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西口昭広、田口哲志
2. 発表標題 Development of sprayable colloidal wound dressing for digestive system cancer therapy
3. 学会等名 2018 TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 西口昭広、田口哲志
2. 発表標題 Colloidal wound dressing with high tissue adhesiveness for digestive system cancer therapy
3. 学会等名 29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西口昭広、田口哲志
2. 発表標題 消化器がん治療に向けた多機能性創傷治癒粒子の開発
3. 学会等名 第56回人工臓器学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西口昭広、田口哲志
2. 発表標題 消化器ガン治療を指向した多機能性創傷治癒粒子の創出
3. 学会等名 第40回バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西口昭広、田口哲志
2. 発表標題 消化器がん治療に向けた噴霧可能な創傷被覆粒子の開発
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	田口 哲志  (TAGUCHI Tetsushi)	物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・グループリーダー	