

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04476

研究課題名(和文) 脊髄損傷の早期修復を目指したアポトーシス細胞模倣型抗炎症ポリマーの開発

研究課題名(英文) Apoptotic cell-mimetic anti-inflammatory polymers for the treatment of spinal cord injury

研究代表者

荏原 充宏 (EBARA, Mitsuhiro)

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・グループリーダー

研究者番号：10452393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷は損傷後時間経過とともに病態が複雑に変化するため、それぞれの時期にそれぞれの病態に即した適切な治療が必要になる。特に後遺症の低減を考えた際、脊髄の外傷自身よりも、その後起きる二次損傷をなるべく早期に抑えることが優先すべき治療となる。こうした背景のもと本研究では、抗炎症薬によって炎症を一過的に止めるのではなく、免疫細胞のフェノタイプを傷害・炎症型(M1型)から保護・抗炎症型(M2型)に誘導可能な新規高分子材料の設計を行った。この高分子を炎症性ミクログリア細胞に添加したところ、優位な抗炎症効果が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷の治療には、長年ステロイド剤などが用いられてきたが、近年その効果に疑問が持たれるようになってきている。実際に、脊髄損傷治療のゴールドスタンダードとされていたメチルプレドニゾロン投与は、2013年にはアメリカ神経外科医協会のガイドラインでもその使用停止が勧告されている。本研究で開発したアポトーシス細胞膜模倣高分子は、やみくもに炎症を抑えるだけでなく、炎症環境を整える効果があり、さらに脊髄損傷の組織治療促進効果に高い期待が持てるため、今までにない脊髄損傷の治療法としてその学術的意義および社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylserine (PtdSer), one of the phospholipids that the apoptotic cell exposes, has emerged for anti-inflammatory therapy via polarizing inflammatory microglia (M1) to anti-inflammatory phenotype (M2). In this study, we report microglia polarization effect of PtdSer-exposing polymeric particles (PSPs). PSPs upregulated M2 microglia and suppressed M1 microglia through peroxisome proliferator-activated receptor gamma upregulation in vitro and in vivo. This study highlights the potential of PSPs for anti-inflammatory therapy.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：抗炎症 脊髄損傷 アポトーシス細胞 スマートポリマー フォスファチジルセリン

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は全世界で普遍的に見られる重篤な疾患で、治療によっても十分な改善が得られず長期にわたって患者のみならず家族も肉体的・精神的負担を強いられる。また、運動麻痺などの後遺症の重症度によっては就学率や社会活動への参加も困難になるため、経済的損失も大きい。脊髄損傷は損傷後時間経過とともに病態が複雑に変化するため、それぞれの時期にそれぞれの病態に即した適切な治療が必要になる。具体的には、一次損傷の24時間以内の超急性期に血中から好中球が動員され、脊髄内在性のミクログリア、アストロサイトが活性化され、次いで数日以内の急性期に、脊髄血液閉門の崩壊とともに血中より動員された単球がマクロファージに分化し炎症性細胞となり、炎症性細胞が放出する炎症性サイトカインやケモカイン、一酸化窒素、フリーラジカルなどによって、浮腫の増大、ひいては周囲細胞の壊死が進行し、炎症の限局化を経てグリア瘢痕が形成され、慢性期へと移行する(Nature Communications 2014;5:5683)。すなわち後遺症の低減を考えた際、脊髄の外傷自身よりも、その後起きる二次損傷をなるべく早期に抑えることが優先すべき治療となる。実際に、早期に神経の炎症を抑えるステロイド剤などが現在用いられているが、その効果には疑問が持たれている(Neurosurgery 2013;72:93)。こうした背景のもと、神経の再生に関する長年の「問い」に対して近年新しい見解が議論されるようになった。それは、やみくもに免疫細胞の活性を抑えるのではなく、むしろ免疫細胞を適切に機能させ誘導させることで傷害を受けた組織を癒す手助けをさせるという説である(J Neuroinflammation 2014;11:98、Nature Neuroscience 2006;9:268)。具体的には、抗炎症薬によって炎症を一過的に止めるのではなく、免疫細胞(マクロファージやミクログリア細胞など)のフェノタイプを傷害・炎症型(M1型)から保護・抗炎症型(M2型)に誘導することで、免疫細胞による自然治癒促進効果を狙うというものである。

2. 研究の目的

われわれの体の中では常に細胞の死と再生が繰り返されている。その際、炎症を起こさない細胞死としてアポトーシスという現象が知られている(Nature 1997;390:350)。本研究では、このアポトーシスの抗炎症作用に着目した。細胞膜成分として知られているフォスファチジルセリン(PS)は通常細胞膜の内側に局在化しているが、細胞がアポトーシスを起こすと外側に露呈される(Cell Death Differentiation 2016;23:962、Trends in Cell Biology 2006;16:189)。これを免疫細胞が認識すると抗炎症的なシグナルが誘導される事が知られている。そこで本研究では、このPS基を側鎖に有するアポトーシス細胞膜模倣高分子の設計とそれを用いた抗炎症効果、さらには脊髄損傷の組織治療促進効果を目的とする。

3. 研究の方法

【MPSポリマーの合成】

PSの活性部位を側鎖に有する新規PS誘導体モノマーの合成方法としては、DNAの固相合成に用いられるホスホロアミダイト試薬を用いた。BOC保護のセリン(N-BOC-L-Serine tert-butyl ester)とホスホロアミダイト試薬(O-tert-butoxy-N,N,N,N-tetraisopropyl phosphorodiamidite)を混和し、imidazole hydrochloride存在下で、2-hydroxyethyl methacrylate(HEMA)を加えることでBOC保護MPSモノマーを得た。分離精製には、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いた。合成したBOC保護MPSモノマーをラジカル重合によって重合した。重合したBOC保護MPSポリマーにtert-butyl hydroperoxide、trifluoroacetic acidを加えることでBOC基の脱保護反応を行う。反応溶液を濃縮後、透析し、さらに凍結乾燥することでMPSポリマーを得た(図1)。

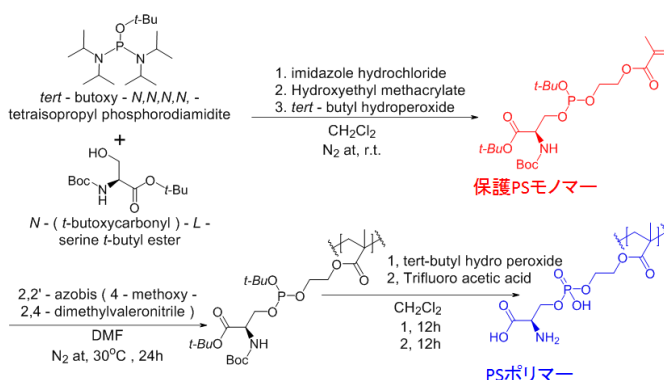


図1. ホスホロアミダイト試薬を用いたPSモノマーおよびポリマーの合成方法。

【抗炎症評価】

マウス由来マクロファージである RAW264.7 およびミクログリア細胞である MG-6 用い、免疫反応において中心的役割を果たす転写因子である核内因子-kB (NF-κB) の活性を測定することで、MPS含有ポリマーの抗炎症活性を評価した。マクロファージとPSポリマーを24時間共培養した後、炎症性刺激として lipopolysaccharide (LPS) を加え、24時間後に NF-κB 活性を測定した。また、蛍光免疫染色(炎症性マクロファージ ; iNOS, 抗炎症マクロファージ ; Arg-1) タ

ンパク発現量測定 (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 1)とし、炎症抑制と組織修復について比較検討した。また、MPS ポリマーを蛍光標識し、トラッキング解析で細胞内取り込みを調べる。

4. 研究成果

【MPS ポリマーの合成】

本研究では、ホスホリルセリン(PS)基含有モノマーを、phosphoramidite 法を出発物とした手法を用いて合成を試みた。phosphoramidite 法では、保護基含有の MPS の合成、単離に成功した。一方で、COP を出発物とした反応では、COP の空気中における開環反応により、続く付加反応が進行せず、合成が困難であった。よって、PS 基含有モノマーの合成には、既報に従った phosphoramidite 法が適すると結論づけられた。さらに、合成した MPS を用いて、フリーラジカル重合により 2 種類のアポトーシス細胞模倣高分子 poly(BMA-co-MPS)および poly(BMA-co-MPC-co-MPS)の重合、評価を行った。¹H-NMR スペクトル測定、GPC 解析から重合の進行が確認され、脱保護も有意に進行したことが確認された。また、poly(BMA)-b-poly(HEMA)を前駆体とした poly(BMA)-b-poly(HEMA-co-MPS)の合成にも成功し、結果として、MPS の組成が異なる 3 種類のランダム共重合体およびブロック共重合体の合成に成功した。次に、透析法を用いたポリマーの自己組織化により、ナノメートルサイズの均一な MPS 粒子の作製に成功した。この MPS 粒子のサイズは、ポリマーの一次構造制御およびポリマーの濃度を調整することにより、制御可能であることが明らかとなった。さらに、MPS 粒子の zeta potential 測定では、PS の構造に含まれる官能基のイオン化に由来する負電荷の値が確認された。また、粒子を構成するポリマーに含まれるモノマーの構造も zeta potential に影響することが確認され、ポリマーの一次構造制御は zeta potential にも寄与し得る可能性が示唆された。このような粒子の物理化学的パラメーターは、高分子粒子の安定性や動態制御の観点において重要であることももちろん、免疫細胞との相互作用にも影響し、生体内の炎症反応にも密接に関係すると考えられる。

【抗炎症評価】

アポトーシス細胞模倣粒子 (MPS 粒子、MPS/MPC 粒子)の抗炎症性能を ELISA および SEAP reporter gene assay により評価した。ELISA による炎症性サイトカインの発現量測定では、アポトーシス細胞模倣粒子の抗炎症性能は、評価のプロトコルに依存することが確認され、適切な評価系として、サンプル添加量および培地洗浄の条件を統一化すること、細胞数を最適化する

ことが重要であると示唆された。作製した粒子 (ミセル)の硬さなどもミクログリア細胞の取り込みに影響を示すことが予想されるため、ポリマーのガラス転移点や粒子密度を示差走査熱量測定 (DSC, Differential Scanning Calorimetry) や粒子/分子分離システム (FFF, Field Flow Fractionation) などを用いて解析した結果、粒子密度の高いものやコア部分の弾性率が高いものがより多くミクログリア細胞に取り込まれることが確認できた。しかしながら、血中滞留性やマクロファージによる貪食などを考えた際に、表面の親水化は重要な要因となるため、血液適合性の高いフォスファチジルコリン基の導入も行った。SEAP reporter gene assay による NF- κ B 活性の評価では、MPS 粒子、MPS/MPC 粒子ともに、ネガティブコントロールよりも有意な NF- κ B 活性の低下が確認され、MPS/MPC 粒子はより炎症抑制効果が高い可能性が示唆された (図 2)。顕微鏡による細胞取り込み挙動の評価では、MPS 粒子、MPS/MPC 粒子のどちらにおいても濃度に依存した取り込みが観察され、貪食やピノサイトーシスなどが抗炎症作用にも関与することが推測される。動物モデルでは、PPAR γ (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ) の活性化が確認できた (図 3)。また、MPS の添加によって、iNOS の発現量が減少し、Arg-1 の発現量が増加する傾向が見られた。以上の結果より、新規に開発した MPS が免疫細胞 (マクロファージやミクログリア細胞など)のフェノタイプを傷害・炎症型 (M1 型)から保護・抗炎症型 (M2 型)に誘導可能であることが証明でき、さらに組織の治癒再生促進効果を示唆する結果が得られた。

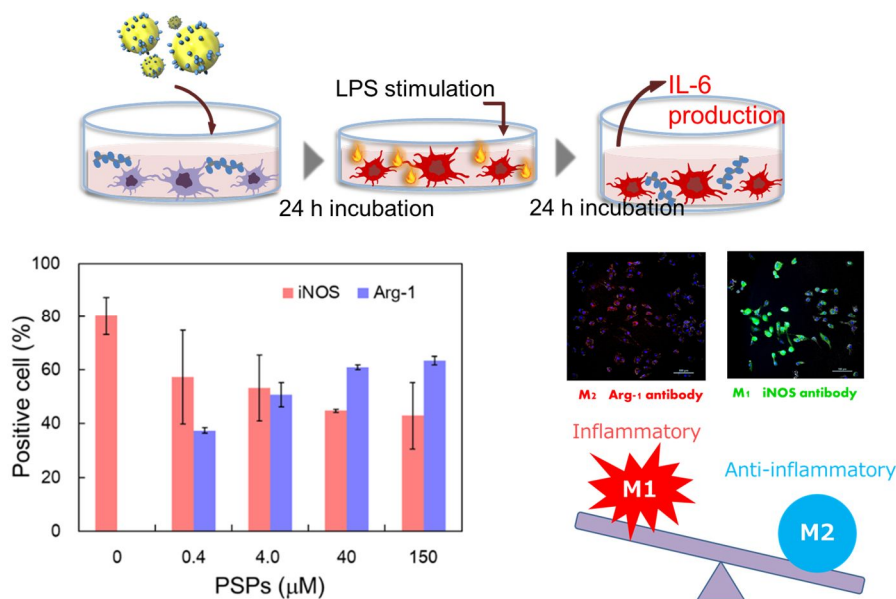


図 2.ミクログリア細胞を用いた抗炎

以上より、本研究で開発したアポトーシス細胞膜模倣高分子は、やみくもに炎症を抑えるだけでなく、炎症環境を整える効果があり、さらに脊髄損傷の組織治療促進効果に高い期待が持てるため、今までにない脊髄損傷の治療法としての可能性が示唆された。

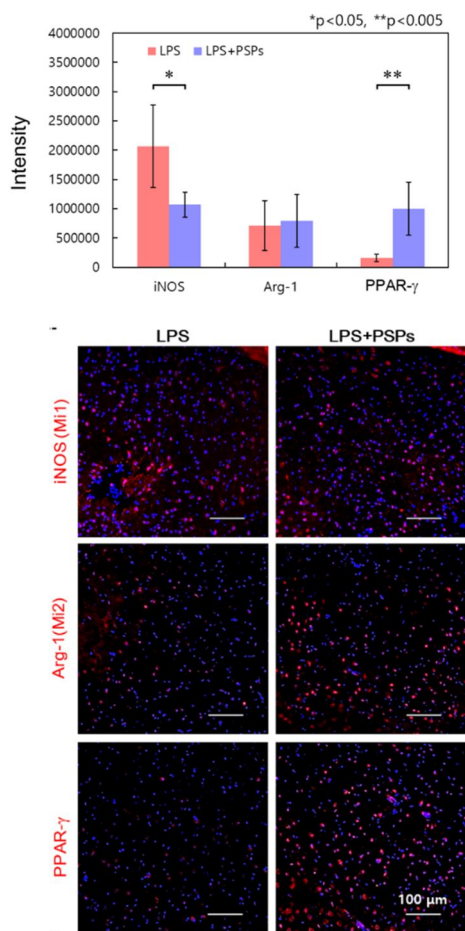


図3.動物モデルを用いた抗炎症試験.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakagawa Yasuhiro, Lee Jeonggyu, Liu Yihua, Abbasi Saed, Hong Taehun, Cabral Horacio, Uchida Satoshi, Ebara Mitsuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Microglial Immunoregulation by Apoptotic Cellular Membrane Mimetic Polymeric Particles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Macro Letters	6. 最初と最後の頁 270 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmacrolett.1c00643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Terufumi, Kaibori Masaki, Fujisawa Nanami, Ishizuka Mariko, Sumiyama Fusao, Hatta Masahiko, Kosaka Hisashi, Matsui Kosuke, Suzuki Kensuke, Akama Tomoya O., Katano Tayo, Yoshii Kengo, Ebara Mitsuhiro, Sekimoto Mitsugu	4. 巻 12
2. 論文標題 Efficacy of Nanofiber Sheets Incorporating Lenvatinib in a Hepatocellular Carcinoma Xenograft Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1364 ~ 1364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano12081364	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 Yoshihara Erika, Sasaki Makoto, Nabil Ahmed, Iijima Michihiro, Ebara Mitsuhiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Temperature Responsive Polymer Conjugate Prepared by "Grafting from" Proteins toward the Adsorption and Removal of Uremic Toxin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1051 ~ 1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27031051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chen Lili, Fujisawa Nanami, Takanohashi Masato, Najmina Mazaya, Uto Koichiro, Ebara Mitsuhiro	4. 巻 22
2. 論文標題 A Smart Hyperthermia Nanofiber-Platform-Enabled Sustained Release of Doxorubicin and 17AAG for Synergistic Cancer Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2542 ~ 2542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mano Sharmy Saimon、Uto Koichiro、Ebara Mitsuhiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Fluidity of Poly (-Caprolactone)-Based Material Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1757 ~ 1757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Yasuhiro、Yano Yuto、Lee Jeonggyu、Anraku Yasutaka、Nakakido Makoto、Tsumoto Kouhei、Cabral Horacio、Ebara Mitsuhiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Apoptotic Cell-Inspired Polymeric Particles for Controlling Microglial Inflammation toward Neurodegenerative Disease Treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 5705 ~ 5713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbiomaterials.8b01510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 荻原 充宏 田崎 朱里	4. 巻 37-2
2. 論文標題 アポトーシス細胞を模倣した抗炎症ポリマーの開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 149 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 荻原 充宏 田崎 朱里	4. 巻 21
2. 論文標題 免疫反応を制御するバイオマテリアル ~ 死細胞から学ぶ巧みな免疫制御システム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 オレオサイエンス	6. 最初と最後の頁 447~453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 劉 懿華 荏原 充宏
2. 発表標題 Apoptotic cell-inspired nanoparticle for anti-inflammation therapy
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田崎 朱里 劉 懿華 荏原 充宏
2. 発表標題 Design of Apoptotic Cell-inspired Anti-inflammatory Polymers to Control The Inflammatory Environment in Immune Cells
3. 学会等名 第8回アジアバイオマテリアル学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田崎 朱里 劉 懿華 荏原 充宏
2. 発表標題 抗炎症MPSポリマーの構造制御とミクログリア細胞の炎症環境に与える影響
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田崎 朱里 劉 懿華 荏原 充宏
2. 発表標題 脊髄損傷におけるミクログリア細胞の炎症抑制を可能にするアポトーシス細胞模倣粒子の設計
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田崎 朱里 劉 懿華 荏原 充宏
2. 発表標題 脊髄損傷部での免疫環境を制御可能なアポトーシス細胞膜模倣高分子の設計
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 劉 懿華 荏原 充宏
2. 発表標題 Apoptotic cell-mimetic nanomaterials for anti-inflammation therapy
3. 学会等名 第8回アジアバイオマテリアル学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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
研究分担者	田中 啓之 (TANAKA Hiroyuki) (00432542)	大阪大学・医学系研究科・特任教授（常勤） (14401)	
研究分担者	飯島 道弘 (IIJIMA Michihiro) (40331988)	小山工業高等専門学校・物質工学科・教授 (52201)	

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
---------	---------