

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20207

研究課題名（和文）免疫拒絶反応を抑制する再生医療用スキャフォールドの創出

研究課題名（英文）Development of immuno-suppressive scaffold for regenerative medicine

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・主任研究員

研究者番号：10784944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、他家細胞に対する免疫拒絶反応を抑制する、再生医療用スキャフォールドを創出することを目的とした。ポリアミンとヒアルロン酸からなるスキャフォールドを作製し、免疫抑制機能について評価した。開発したスキャフォールドは、高い生体適合性・足場機能・免疫抑制能を有していることが明らかになり、細胞を内包することによって、細胞のデリバリー担体として機能することを見出した。本手法は、再生医療における免疫拒絶反応を抑制し、移植効率を高める手法として有用であると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、再生医療を加速する基盤的な研究として、医療イノベーションを推進し、心不全や脊髄損傷、糖尿病などの難治性疾患治療や移植片対宿主病の予防に対する医療シーズの創出へと大きな波及効果をもたらすと期待される。他家細胞による再生医療は、生涯寿命・健康寿命の延伸に貢献し、2050年に約2.5兆円に達する再生医療市場の発展にも寄与する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a regenerative scaffold that suppresses immune rejection of allogenic cells. Scaffolds made of polyamine and hyaluronic acid were fabricated and evaluated for their immunosuppressive function. The developed scaffold was found to possess high biocompatibility, scaffold function, and immunosuppressive functions. Moreover, we found that the scaffold functioned as a cell delivery carrier by encapsulating cells. This method would be useful for suppressing immune rejection in regenerative medicine and enhancing transplantation efficiency.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：再生医療 組織再生 免疫制御 ポリアミン 足場材料 抗炎症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

再生医療とは、機能不全に陥った臓器を患者自身の細胞を用いて治療する方法である。特にわが国では、2007年にヒト人工多能性幹細胞が報告されて以降、再生医療の実用化研究が飛躍的に進んでいる。一方で、再生医療製品の製造と管理には莫大なコストと時間がかかるため、他人の細胞(他家細胞)を用いた臨床試験が進められている。しかしながら、主要組織適合抗原の違いから、マクロファージやエフェクターT細胞による炎症性サイトカイン産生や貪食などの激しい免疫拒絶反応が起き、移植細胞が生着しないことが問題である(PNAS, 112, 14452 (2015))。例えば、膵島移植においては、移植した膵島の60%が20分以内に拒絶反応によって脱離するため、移植直後(急性期)の免疫拒絶反応をいかに抑制するかが課題である。移植治療時の免疫拒絶反応を抑制するために、免疫抑制剤の全身投与が行われるが、高血圧や糖尿病、がん、感染症などの合併症のリスクがあり、また、免疫抑制剤自体が移植細胞にダメージを与えることも問題である(Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 288, E365 (2005))。

移植細胞の生着率の向上に向けては、細胞の接着場として機能する足場材料(スキャフォールド)が有用である。R. Langer教授とJ. Vacanti教授によって組織工学が提唱されて以降(Science, 260, 920-926(1993))、スキャフォールドを用いた細胞移植研究が進められている。スキャフォールドを用いて生体外で予め組織化することで、移植細胞の生着率を向上させることができる。しかしながら、いくらスキャフォールドを用いて生体外で組織化しても、免疫拒絶反応によって細胞死が起きることが課題であった。細胞移植時の生着率を高めるには、多細胞-材料間の相互作用機序を分子レベルで理解し、接着足場としての機能と局所的な免疫抑制機能を兼ね備えたスキャフォールドを開発することが求められる。

2. 研究の目的

本研究では、他家細胞に対する免疫拒絶反応を抑制する、再生医療用スキャフォールドを創出することを目的とする。高い生体適合性・足場機能・免疫抑制能を有するヒアルロン酸誘導体からなるスキャフォールドは、免疫拒絶反応を抑制しながら組織再生を促進することで、移植効率を向上させる。オリゴエチレンジアミンを生体高分子であるヒアルロン酸に化学的にコンジュゲートしたヒアルロン酸誘導体(免疫抑制ヒアルロン酸)を用いて、スキャフォールドを作製する。高分子量化したオリゴエチレンジアミンは、ミトコンドリアへの膜透過性が抑制されるため、生体適合性が向上すると期待される。高分子量ヒアルロン酸の高分子鎖の絡み合いによる物理架橋とオリゴエチレンジアミンによる部分的な化学架橋によってハイドロゲル(免疫抑制スキャフォールド)を作製する。

図1に示すように、免疫抑制スキャフォールドを合成し、細胞を内包し、生体組織への移植を行う。その際、修飾したポリアミンによって免疫細胞の炎症反応・貪食機能を抑制し、周辺組織からの細胞浸潤を誘導することで、臓器再生を促進する。本研究によって、細胞-材料のバイオ界面や多細胞間相互作用のダイナミクスを解析することで、免疫抑制機構を理解する。スキャフォールドを用いて移植細胞の機能を長期的に維持できれば、他家細胞を用いた再生医療の実現に貢献すると期待される。

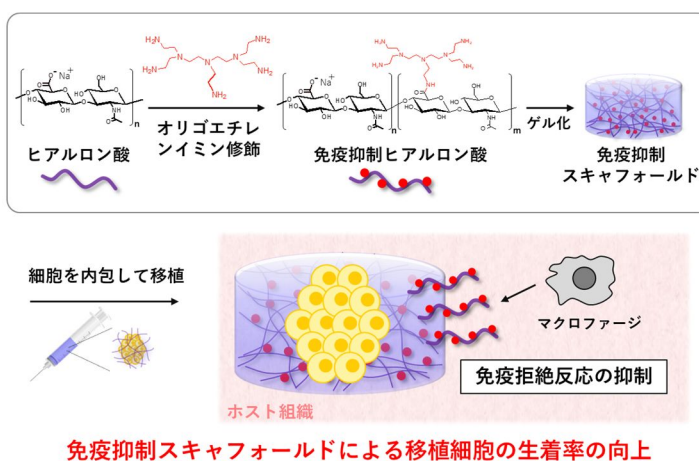


図1. 本研究で開発する免疫抑制スキャフォールドを用いた再生医療治療のイメージ

3. 研究の方法

本研究では、(1)抗炎症ポリアミンの探索、(2)免疫抑制スキャフォールドの構築、(3)免疫抑制機能の解析、(4)細胞移植試験の検討を行った。

(1) 抗炎症ポリアミンの探索

種々のポリアミンまたは bOEI-HA の抗炎症機能を評価するために、リポ多糖 (LPS、100 ng/mL) で活性化した 3×10^4 個の初代骨髄由来マクロファージ (Bone marrow derived-macrophage, BMDM) に対して、ポリアミン (0.1 mg/mL) を加えた。ポリアミンとして、ethylamine (EA)、aminoethanol (AE)、ethylene diamine (EDA)、1,3-diaminopropane (DAPr)、1,5-diaminopentane (DAPE)、1,2-bis(2-amino ethoxy)ethane (AEE)、branched oligoethyleneimine (bOEI)、polyethyleneimine (PEI)、polypropyleneimine dendrimer generation 1-3 (G1, G2, G3-PPI)、L-lysine (K)、polye-L-lysine (PLL) を検討した。24 時間培養後に上清を回収し、BMDM から産生された腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) の濃度を酵素結合免疫吸着法 (ELISA 法) によって定量した。さらに bOEI と鶏冠由来ヒアルロン酸 ($M_w=1,000$ kDa) を水溶性カルボジイミド (EDC) と *N*-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) の存在下で、縮合反応させることで合成した bOEI 修飾ヒアルロン酸を合成し、同様の細胞試験を行った。

(2) 免疫抑制スキャフォールドの構築

ヒアルロン酸 (10 mg/mL) と bOEI-600 (0.5-4 mg/mL)、ブタ皮膚由来ゼラチン (25-150 mg/mL) を、縮合剤の存在下で縮合反応することによってゲル化反応を進行させ、ハイドロゲルを作製した。得られたハイドロゲルを凍結乾燥することによってポリアミンで修飾された多孔体 (免疫抑制スキャフォールド) を作製した。ゼラチンや bOEI の分子量や導入率、濃度を制御することで、材料の力学特性や免疫抑制機能が異なる種々のスキャフォールドを作製した。走査型電子顕微鏡 (Scanning electron microscopy, SEM) による観察を行い、スキャフォールドの表面構造を観察した。また、レオメーターを用いた粘弾性試験によって、膨潤した状態のスキャフォールドの力学特性を評価した。

(3) スキャフォールドの免疫抑制機能の解析

スキャフォールドの免疫抑制機能を評価するために、 1×10^5 個の BMDM を播種し、24 時間培養した。LPS (100 ng/mL) の存在下でさらに 24 時間培養し、上清を回収し、炎症性サイトカインの産生量を ELISA 法で評価した。また、WST-8 アッセイを行うことによって、BMDM の細胞生存率を評価した。また、シグナル経路を探索するために、遺伝子マイクロアレイによって炎症関連遺伝子の解析を行い、分子構造と免疫応答の相関を評価した。

(4) スキャフォールドを用いた細胞移植試験

免疫抑制スキャフォールドにマウス筋芽細胞株 (C2C12 細胞) を播種し、マウスに移植した。疾患モデルとして、筋組織を損傷させたモデルである Volumetric muscle loss (VML) モデルを用いた。ルシフェラーゼを発現した C2C12 細胞をスキャフォールドに播種し、マウス (C3H、オス、8-10 週) の組織損傷部に移植した。移植から 1 週間後に、マウスにルシフェリンを腹腔投与し、*in vivo* イメージングシステム (IVIS) によって発光観察を行い、細胞の生着を確認した。

4. 研究成果

(1) 抗炎症ポリアミンの探索

抗炎症機能を示すポリアミンを探索することを目的として、種々のポリアミンと LPS で活性化した BMDM を用いた細胞試験を行った。分子量や分岐数、アミノ基の数など構造が異なる様々なポリアミン分子を BMDM に添加し、24 時間後の TNF- α の産生量を ELISA で評価したところ、分子量が 300 または 600 の bOEI (bOEI-300、bOEI-600) が高い細胞適合性と抗炎症性を示すことが明らかとなった (図 2)。培地のみ添加した場合においては、細胞の形状が未処理とは大きく異なり、接着面積が大きくなりアスペクト比が低下した。一方で、bOEI-300 や bOEI-600 を添加した細胞では、細胞の形状に大きな変化は見られなかった。また、より分子量が大きいポリエチレンイミン ($M_w=10,000$ Da) においては、細胞死が見られており、細胞適合性が低いことが示された。bOEI-300 および bOEI-600 は、他のポリアミンと比較して最も細胞適合性と抗炎症性に

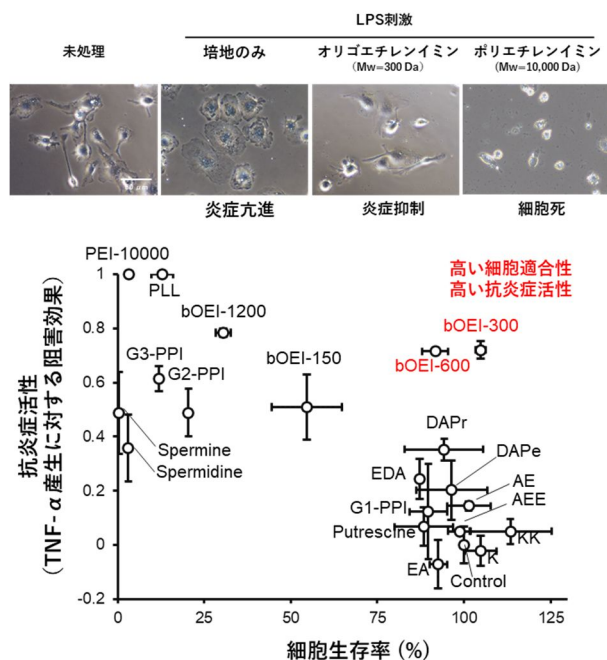


図 2. 細胞生存率と TNF- α 産生の阻害効果の評価による抗炎症ポリアミンの探索

に最も適合性が高いことが示された。

優れていることが明らかとなった。また、bOEI をヒアルロン酸に修飾した bOEI ヒアルロン酸は、bOEI 単独と同等の抗炎症機能を有しており、未処理群と比較して、TNF- α の産生を約 4.5 倍抑制した。さらに、bOEI 単独と比較して、bOEI-HA は高い細胞生存率を示しており、細胞親和性の高い材料であることが明らかとなった。これらの結果から、bOEI は、高分子に修飾した場合にも抗炎症機能を発現するため、スキャフォールドに固定した場合にも、単独の場合と同様に抗炎症機能を示すと考え、スキャフォールドへの固定条件の検討を行った。

(2) 免疫抑制スキャフォールドの構築

ヒアルロン酸と bOEI-600、ゼラチンを縮合剤存在下でゲル化させ、洗浄後に凍結乾燥することでスキャフォールドを得た。なお、物理ゲルについても検討を行ったが、力学特性が十分ではなかったため、化学架橋したゲルを用いて研究を行った。スキャフォールドの SEM 観察を行ったところ、表面に 50 μm 以上のポアが形成されていることが分かった (図 3a)。これらのポアは凍結乾燥時に形成されたものであり、これによって播種した細胞がスキャフォールド内部にまで到達すると考えられる。また、レオメーターを用いた粘弾性測定の結果より、作製したスキャフォールドの貯蔵弾性率 (G') が損失弾性率 (G'') を上回っており、ゲル化していることが確認された (図 3b)。当初の計画ではヒアルロン酸と bOEI-600 のみでハイドロゲルを作製する予定であった

が、この 2 成分のみでは弾性率が十分ではないことが粘弾性試験の結果より示されたため、スキャフォールドの強度を向上することを目的として、ゼラチンを使用した (図 3c)。その結果、ゼラチンの濃度に依存して G' が増加することが明らかとなった。この結果から、スキャフォールドの力学特性はゼラチン濃度によって制御可能であり、本研究ではヒアルロン酸と bOEI-600 にゼラチンを加えたスキャフォールドを作製し、後の実験に用いた。一方で、抗炎症機能を有する bOEI-600 の濃度はスキャフォールドの力学特性には大きく影響しなかった。

(3) スキャフォールドの免疫抑制機能の解析

作製した免疫抑制スキャフォールドを用いて、BMDM を培養し、LPS で活性化することで、炎症反応に対するスキャフォールドの免疫抑制効果を評価した。その結果、オリゴエチレンイミンを複合化することで、マクロファージから産生される TNF- α が低減されることが明らかとなった (図 4a)。この免疫抑制効果は、添加する bOEI-600 の濃度に依存しており、2 mg/mL の bOEI-600 を用いた場合に最も高い免疫抑制効果が確認された。一方で、bOEI-600 の濃度が 4 mg/mL の条件においては、TNF- α の産生量が増加しており、免疫抑制効果が低いことが分かった。細胞毒性試験の結果から、bOEI-600 が 4 mg/mL の条件では、細胞毒性が出ることを示されており、そのため TNF- α の産生量が増加したと考えられる (図 4b)。これらの結果より、bOEI-600 を固定化したスキャフォールドは免疫抑制機能を有していることが明らかとなり、bOEI-600 の濃度を 2 mg/mL とし以降の実験を行った。さらに、bOEI の抗炎症メカニズムの解析を行うために、リン酸化アレイを用いたアッセイを行った。炎症反応関連タンパク質に関するリン酸化アレイによって免疫抑制機構の解析を行い、作用機序の解明を進めた。

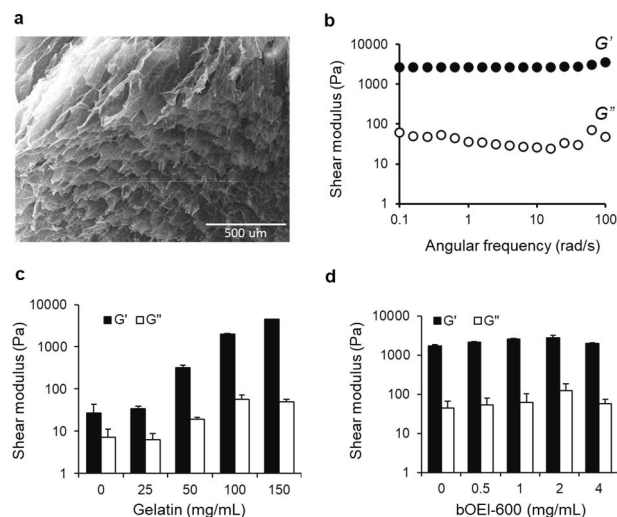


図 3. (a)免疫抑制スキャフォールドの SEM 画像、(b)スキャフォールドの周波数依存的な粘弾性特性の評価、(c,d)スキャフォールドのゼラチン濃度および bOEI-600 依存的な弾性率の変化

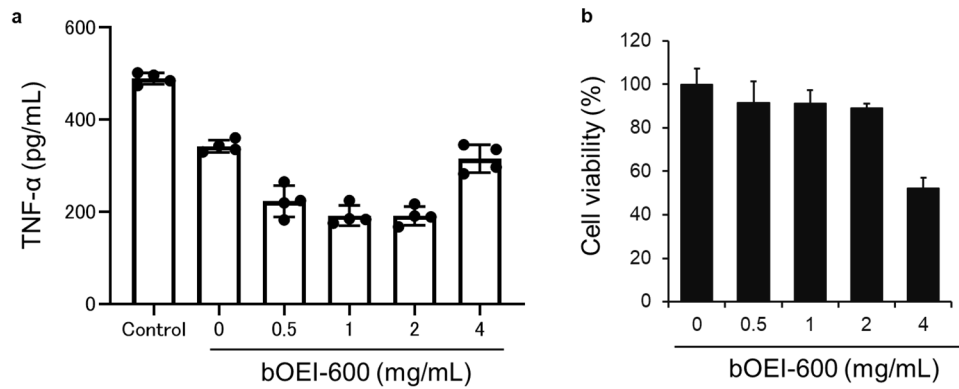


図 4. (a,b) スキャフォールド中で培養された BMDM から産生された TNF- α の定量結果と細胞生存率の結果、BMDM は LPS によって活性化

(4) スキャフォールドを用いた細胞移植試験

免疫抑制スキャフォールドを用いた細胞移植試験を行った。マウスの大腿四頭筋を損傷させた VML モデルに対して、ルシフェラーゼを発現する C2C12 細胞を播種したスキャフォールドを移植し、IVIS によってイメージングした。その結果、移植した細胞は 2 週間後において移植部位に生着していることが示された (図 5)。今後、細胞の生着率や損傷部位の治癒効果について、組織学的評価やフローサイトメトリー、遺伝子発現解析による詳細な検討を行う予定である。また別の疾患モデルとして、慢性肝炎モデルの作製についても検討を行っており、D-ガラクトサミンと LPS の頻回投与によって、マウス慢性肝炎モデルが作製できることを確認している。今後、慢性肝炎モデルに対するスキャフォールドを用いた細胞移植の治療効果についても評価を進める予定である。

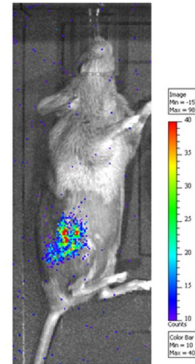


図 5. C2C12 細胞とスキャフォールドを移植したマウス VML モデルの IVIS によるイメージング画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 西口昭広	4. 巻 3
2. 論文標題 再生医療のためのバイオマテリアル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 55-60
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 Nishiguchi Akihiro, Taguchi Tetsushi	4. 巻 31
2. 論文標題 Oligoethyleneimine Conjugated Hyaluronic Acid Modulates Inflammatory Responses and Enhances Therapeutic Efficacy for Ulcerative Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2100548 ~ 2100548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adfm.202100548	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西口昭広, 田口哲志
2. 発表標題 抗炎症作用を示すポリアミンの探索と抗炎症多糖の創出
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西口昭広, 田口哲志
2. 発表標題 オリゴエチレンイミンによる免疫応答制御と炎症性疾患治療への応用
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 西口昭広、田口哲志
2. 発表標題 生体組織接着を実現する材料設計
3. 学会等名 第28回次世代医工学研究会
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

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