

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592981

研究課題名(和文)再生組織移植におけるマクロファージ・ポラリゼーションの解析と再生医療への応用

研究課題名(英文) Investigation on phenotypes of macrophages in transplantation of engineered tissues and its application to regenerative medicine

研究代表者

藤原 夕子 (Yuko, FUJIHARA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50466744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：再生軟骨移植におけるマクロファージのサブクラスを同定し、その局在制御による再生軟骨医療への応用を検討した。ヒト耳介軟骨細胞とポリ乳酸足場素材を用いて再生軟骨を作製した後、免疫不全マウス背部皮下へ移植した。移植後2週にかけてF4/80陽性マクロファージが増加する過程で、早期にはM1マクロファージが優位に、移植後2週前後でM2マクロファージの局在が増加する傾向が示された。更に、薬剤投与により移植直後のマクロファージを抑制したところ、移植後8週におけるsGAGの蓄積が有意に増加した。移植後早期に出現するM1傾向のマクロファージの局在を抑制することにより、軟骨成熟を促進できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the properties of macrophages in transplantation of tissue-engineered cartilage. As to methods, human auricular chondrocytes were cultured and embedded in polylactic acid scaffold, and then transplanted subcutaneously in BALB/c-nu/nu mice. Immunohistochemical localization of F4/80-positive cells was increased by 2 weeks. Meanwhile, M1-prone macrophages were dominant in the early-stage of transplantation up to around 2 weeks, and then M2-prone macrophages surpassed them after that. Furthermore, suppressing macrophages with clodronate liposome immediate after transplantation increased the accumulation of sGAG at eight weeks. It was therefore suggested that suppression of early-stage macrophages, which were considered to be M1-prone, could be advantageous for cartilage regeneration.

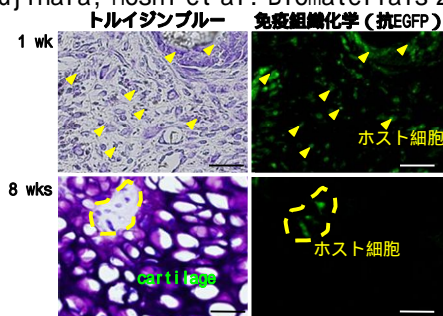
研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 軟骨再生 組織反応

### 1. 研究開始当初の背景

口腔・顎顔面領域では歯槽骨や歯根膜に対する再生医療が盛んに研究されているほか、軟骨再生医療も隆鼻術やオトガイ形成において自家軟骨細胞を移植する方法が既に臨床応用されている (Yanaga et al. *Plast Reconstr Surg* 2006)。しかし現行法は、患者から採取した軟骨細胞を、足場素材を用いず細胞懸濁液/ゲルの形状で移植する方法を採るため、適応が局所的な軟骨欠損に限られている。適応を多様な症例に拡大するためには、再生組織に3次元形態と力学的強度を付与する足場素材の併用が必要不可欠であるが、一方で、生体にとって異物である足場素材は、移植後に過剰な組織反応を惹起し組織再生を阻害する可能性も危惧される。実際、1990年代より米国ハーバード大学をはじめ、国内外の多くの研究グループが足場素材を用いた軟骨再生を試みているが、免疫不全動物であるヌードマウスでは成功するものの、正常な免疫系を有する動物では過度の組織反応により非常に困難となることが知られている。

われわれはこれまで、足場素材を用いた再生軟骨移植法に関する検討を行ってきたが、適切な足場素材の導入や、投与細胞数の最適化などにより、正常な免疫機能を有するC57BL/6Jマウスでの軟骨再生に成功した (Yamaoka, Hoshi et al. *J Biomed Mater Res A* 2010、Tanaka, Hoshi et al. *Biomaterials* 2010)。更に、再生軟骨移植における組織反応を詳細に解析するため、EGFP遺伝子導入マウス (EGFP-C57BL/6J) をホストに用いて同系移植を行い、EGFP蛍光を指標にホスト由来細胞の動態を経時的に追跡した。その結果、ホスト由来細胞はその殆どがF4/80陽性のマクロファージであり、移植後急激に増加した後、軟骨の成熟が進む移植後2週以降、著しく減少することが明らかとなった (Fujihara, Hoshi et al. *Tissue Eng Part A* 2009、Fujihara, Hoshi et al. *Biomaterials* 2010)。



移植後1週で数に性用存在しているホスト由来細胞は経時的に減少し、移植後8週では非軟骨領域にのみ存在する。

近年、免疫学の進歩に伴い、マクロファージには多様性があり、TNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ など炎症性サイトカインを分泌する炎症促進性マクロファージ (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マクロファージ (M2) のサブクラスに大別されることが報告されている。更に、

M1/M2 サブクラスの存在比率 (ポラリゼーション) が、炎症のみならず、腫瘍や動脈硬化など様々な疾患において病態の重篤度や予後に深く関与していることも明らかとなりつつある。再生軟骨移植における組織反応は、これまで、総マクロファージ数や炎症性サイトカイン発現量により評価がなされてきており、マクロファージのポラリゼーションの視点からの検討はなされていない。しかし、M1/M2 サブクラスの特徴を勘案すると、M1 優位のポラリゼーションにより組織反応が進行すれば、再生軟骨組織の成熟が抑制されることが推察される一方、M2 優位のポラリゼーションが実現すれば、軟骨再生に促進的に働くことが期待される。従って、再生軟骨組織におけるマクロファージのポラリゼーションは、軟骨細胞の生存性や分化、再生軟骨の成熟に強く影響を与えるものと考えられる。

### 2. 研究の目的

足場素材を用いた再生軟骨において、異物組織反応の中心を担うマクロファージのポラリゼーションを解明する共に、得られた知見を再生軟骨移植の組織反応制御に反映させ、再生軟骨医療の発展に貢献することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト再生軟骨移植

ヒト耳介軟骨細胞とポリ乳酸足場素材を用いて再生軟骨を作製した後、BALB/c-nu/nuマウス背部皮下へ移植した。経時的に移植片を摘出し、免疫組織化学染色や遺伝子発現検討により、マクロファージの局在やサブクラスを同定した。

#### (2) 3次元包埋培養

C57BL/6Jマウス骨髄由来マクロファージを培養したのち、LPS、IFN- $\gamma$ あるいはIL-4を添加し、M1およびM2マクロファージを誘導した。それぞれのサブセットの培養上清を回収し、ヒト耳介軟骨細胞の3次元培養でコンディションドメディウムとして添加した。1週間後に細胞を回収し、組織学評価ならびに遺伝子発現を検討した。

#### (3) マウス再生軟骨同系移植

再生軟骨移植における移植後早期のマクロファージの影響を検討するため、マクロファージアポトーシス誘導剤の clodronate liposomes (ClodronateLiposomes.org) を、移植時に 200  $\mu$ L 腹腔投与した。

### 4. 研究成果

#### (1) 再生軟骨組織におけるマクロファージの局在

トルイジンブルー染色では、移植後14日以降、メタクロマジー領域の増加を認めた。HE染色においても、移植後経時的に軟骨の成熟が進み、28日には基質の蓄積を伴う軟骨組織が観察された。抗F4/80免疫組織化学染色ではF4/80陽性マクロファージは、移植後7日

後にかけて再生軟骨組織の辺縁に認められた。その後、再生軟骨内部において散在性に局在が観察され、移植後 28 日には軟骨領域の周辺に偏在するようになった。M2 マクロファージの局在を検討するため、抗 Arginase 1 抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、移植後 7 日で再生軟骨の周囲に発現が観察され、その後内部に散在性に局在したが、移植後 28 日には、ほとんど認められなくなった。

(2) 再生軟骨組織における M1/M2 マクロファージ関連因子の発現

ヒト耳介軟骨細胞をもちいて作製した再生軟骨を、BALB/c-nu/nu へ移植した後、継時的に回収し、ホスト由来細胞の遺伝子発現を検討した。Gapdh の発現の増加から、ホスト由来細胞が移植後 4 日から 7 日にかけて、増加していることが推察された。M1 マクロファージのマーカーとして検討した *Il1-β* や *Il-6* は、移植後早期にかけて発現上昇した。*Arg1* は免疫組織化学染色の結果と一致し、移植後早期での発現が顕著で、その後減少傾向を示した。*Il-10* や *Ym1* は移植後早期から発現がみとめられた。*Fizz1* は、少し遅れて発現増加が観察された。M2 マクロファージの発現パターンは概して遅めで、長期にわたり発現が観察された。

(3) マクロファージのサブセットが軟骨再生に与える影響

M1 および M2 マクロファージを誘導し、それぞれのサブセットの培養上清を、軟骨細胞の 3 次元培養でコンディショントレディウムとして添加した。1 週間後のトルイジンブルー染色で、M2 マクロファージの培養上清を添加した軟骨細胞では、メタクロマジーが亢進し、軟骨基質の増加が示唆された。実際、遺伝子発現においても *COL2* の発現上昇が認められた。一方 M1 マクロファージの培養上清を添加した軟骨細胞では、*COL2* の発現が低下していた。M1 マクロファージは軟骨分化抑制的に、M2 マクロファージは軟骨分化促進的に作用する可能性が示唆された。

(4) Clodronate liposome を用いたマウス再生軟骨移植

M1 マクロファージが出現する移植後早期のマクロファージを抑制するため、再生軟骨の移植時に clodronate liposome を腹腔内に投与した。トルイジンブルー染色や sGAG の蓄積から、移植後の軟骨基質が増加することが示された。

## 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 2 件)

Takato T, Mori Y, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Ogasawara T, Saijo T, Abe T, Abe M, Suenaga H, Kanno Y, Sugiyama S, Hoshi K.: Preclinical and clinical research on bone and cartilage

regenerative medicine in oral and maxillofacial region. Oral Sci Int. 2014;11(2):45-51. 査読有 . URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1348864314000081>

Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Macrophage-inducing fasl on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration. Stem Cells. 2014 May;32(5):1208-19. 査読有 . doi: 10.1002/stem.1636.

〔学会発表〕(計 5 件)

藤原夕子, 高戸毅, 星和人: マクロファージのサブクラスが軟骨再生に与える影響. 第 35 回日本炎症・再生医学会 2014 年 7 月 1-4 日 万国津梁館, 沖縄

藤原夕子: 再生軟骨組織におけるマクロファージ・ポラリゼーション. 第一回細胞加工・細胞治療研究会. 東京(東京大学). 2014 年 6 月 28 日.

Fujihara Y, Hoshi K.: Phenotypes of macrophages in transplantation of tissue-engineered cartilage. 第 42 回日本免疫学会総会. 2013 年 12 月 11 日 幕張メッセ, 千葉

Fujihara Y, Takato T, Hoshi K.: Macrophage-inducing FasL on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration. Frontiers 2013 EPFL Symposium. June 21-22, 2013. École Polytechnique Fédérale de Lausanne, EPFL Lausanne, EPFL, Lausanne, Switzerland.

藤原夕子, 高戸毅, 星和人: 再生軟骨移植における組織反応抑制メカニズムの解析とその臨床応用. 第 67 回日本口腔科学会学術集会 2013 年 5 月 22-24 日 栃木県総合文化センター, 宇都宮

藤原夕子, 高戸毅, 星和人: 再生軟骨移植におけるマクロファージサブクラスの検討. 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 21-23 日 パシフィコ横浜, 神奈川

〔図書〕(計 1 件)

藤原夕子, 星和人, 高戸毅: 第 1 章 第 5 節 [5] 口腔外科で起こるトラブルと求められる足場材料 「体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件」 68-71 佐藤章弘 編集, 技術情報協会, 東京, 2013

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 夕子 (FUJIHARA, Yuko)

東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号: 50466744

(2) 研究分担者

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

森 良之 (MORI, Yoshiyuki)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70251296

(3) 連携研究者

高戸 毅 (TAKATO, Tsuyoshi)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：90171454