

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) マクロファージと幹細胞の動態制御メカニズムに基づく生体活性ナノクレイ-抗炎症性分極化誘導ゼラチン粒子複合体による骨再生誘導技術の開発
(英語) Elucidating and modulating macrophage and stem cell responses to bioactive nanoclays for bone regeneration

研究開発実施期間: 令和2年9月16日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 田畑 泰彦
(英語) Yasuhiko TABATA

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人京都大学・医生物学研究所・教授
(英語) Professor, Institute for Life and Medical Sciences, Kyoto University

II 研究開発の概要

【和文】

本研究の背景・目的・意義

再生治療には、体外から細胞を移植する方法（細胞移植治療）と体内の細胞を利用する方法（体内再生誘導治療）がある。このいずれの方法においても、再生誘導部位の細胞の微小環境をコントロールすることが重要となる。近年、炎症が再生現象と深くかかわっていることが明らかとなっている。再生には炎症を伴うが、炎症の持続（慢性化）は、しばしば生体組織の再生修復を阻害する。そのため、生体組織の再生修復を効率的に誘導するには、再生誘導部位に再生に関わる幹細胞を集める（動員する）ことに加えて、再生誘導部位の炎症環境を沈静化し、再生へ向かう環境に誘導していくことが必要である。

マクロファージは、すべての炎症過程で関与する細胞であり、「炎症性」と「抗炎症性」という、相反した2つの表現型をもち、炎症をコントロールしている。これまでにわれわれは、このような炎症におけるマクロファージの役割に着目し、マクロファージの表現型を人為的に抗炎症性へと誘導（抗炎症性分極化）するバイオマテリアル技術を開発してきた。実際に、ゼラチンハイドロゲルを用いて抗炎症性分極化を誘導す

る因子（ピオグリタゾン（PIO））を徐放化することによって、マクロファージの抗炎症性分極化に成功している（Tabata Y et al., Wound Repair Regen 24, 57 (2016)など）。

英国サウサンプトン大学の Jonathan Dawson 博士らは、生体シグナル因子を吸着したナノサイズの粘土である、生物活性ナノクレイを開発し、この生物活性ナノクレイを埋入することによって、体内の幹細胞を動員し、種々の生体組織再生を誘導することに成功している（Dawson, J. I., et al. Advanced Materials 23, 3304 (2011)など）。この生物活性ナノクレイ技術に上記の抗炎症性分極化技術を組み合わせることができれば、再生誘導治療効率のさらなる向上が期待できる。

そこで本研究では、体内幹細胞の動員とマクロファージの抗炎症性分極化の誘導を同時に実現するバイオマテリアルを日英共同（日本側研究代表者：田畑泰彦博士（国立大学法人京都大学）、英国側研究代表者：Jonathan Dawson 博士（サウサンプトン大学））で開発し、そのバイオマテリアルの骨再生誘導における有効性を評価する。すなわち、「抗炎症性分極化誘導ゼラチンハイドロゲル（PIO 等を徐放化するゼラチンハイドロゲル）」と「生物活性ナノクレイ（骨形成因子（BMP）を吸着したナノクレイ）」とを複合体化する。複合体の物性を調べるとともに、マクロファージとの相互作用およびマクロファージ-幹細胞クロストークに与える影響を *in vitro* および *in vivo* で検証する。最終的に、最適化された複合体の骨再生誘導効果を評価する。

本研究は、再生誘導部位での炎症環境をコントロールすることにより、生体組織再生誘導の効果を増強させる技術の開発である。通常、いずれの組織再生誘導部位においても、炎症は起こることから、炎症環境をコントロールするという開発技術は、再生組織の対象は限定されない。そのため、研究開発された技術は、様々な生体組織の再生に応用でき、その汎用性は高いと考える。また、炎症環境をコントロールする材料技術は、他の組織再生誘導技術と組み合わせることも可能であり、これまでに開発されてきた組織再生誘導効率をさらに向上させる切り札となることが期待される。加えて、本研究では、炎症環境コントロールが組織再生誘導効果を増強させるメカニズムの解明も行う。このことにより、炎症と再生の接点が明らかとなり、その学術的なインパクトは大きいと信じる。

本研究の進め方

研究を効率的に遂行するため、以下の4つの研究開発項目（1～4）を設定し、実施した。

1. 生体活性ナノクレイとマクロファージとの相互作用の評価（英国で実施）
2. 複合体の創製およびマクロファージとの相互作用の評価（日本で実施）
3. 複合体がマクロファージ-幹細胞クロストークに与える影響の評価（英国で実施）
4. 最適化複合体による骨再生誘導（日本と英国で共同実施）

研究開発の成果

日本で実施した研究開発の成果を以下に示す。

研究開発項目2：複合体の創製およびマクロファージとの相互作用の評価

①PIO 徐放化ゼラチンハイドロゲルの新規作製法の開発

これまで、難水溶性である PIO をゼラチンハイドロゲルから徐放化するためには、「PIO の水可溶化」および「水可溶化 PIO のゼラチンハイドロゲルへの組み込み」という材料学的観点から複雑な工程が必要であった。本研究では、PIO のメタノール溶液あるいは塩酸溶液をゼラチンハイドロゲルへ含浸し、メタノールの蒸発あるいは塩酸の洗浄を経て、ゼラチン鎖のもつ界面活性能を利用して PIO を担持させるという簡便な方法を新たに開発した。本手法を用いて作製した PIO 含浸ゼラチンハイドロゲルにおけるハイドロゲル分解および PIO 放出挙動を試験管レベルで評価した。その結果、PIO 含浸にメタノールを用いるとゼラチンハイドロゲルの分解が遅延することがわかった。塩酸を用いた場合、PIO をゼラチンハイドロゲルへ内包する

ことができた。加えて、PIO はゼラチンハイドロゲルの分解とともに放出されることがわかった。

②放出 PIO によるマクロファージ分極挙動の評価

Balb/c マウス(雄性 6 週齢)から採取した骨髄細胞へマクロファージコロニー刺激因子を添加し、マクロファージへ分化誘導した。得られた骨髄由来マクロファージをリポ多糖およびインターフェロン γ を含む培養液で培養し、M1 マクロファージへ分極した。この M1 マクロファージを、ゼラチンハイドロゲルから放出された PIO (放出 PIO) とともに培養し、マクロファージの腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 産生量を測定した。M1 マクロファージからの産生は、PIO により有意に抑制された。放出 PIO による TNF- α 産生抑制の程度は、同濃度の遊離 PIO と同等であった。この結果より、放出 PIO もマクロファージの分極活性を有することが示された。

③ゼラチンハイドロゲルの in vivo 分解挙動の評価

ゼラチンハイドロゲルおよび PIO 内包ゼラチンハイドロゲルを Balb/c マウス (雄性 6 週齢) 背部皮下へ埋入した。一定期間後のハイドロゲルの外観を観察した。ハイドロゲルの in vivo 分解挙動は、PIO 内包の有無には依存しないことがわかった。続いて、種々の架橋度の PIO 内包ゼラチンハイドロゲルおよび生物活性ナノクレイとの複合体を、同様にマウス背部皮下へ埋入し、一定期間後の外観を観察した。その結果、ハイドロゲルの分解は、生体活性ナノクレイの存在により遅くなることがわかった。

④PIO 内包ゼラチンハイドロゲル-生体活性ナノクレイ複合体の埋入による異所性骨形成挙動の評価

PIO 内包ゼラチンハイドロゲルおよび生体活性ナノクレイとの複合体をマウス背部皮下へ埋入した。埋入 7 および 14 日後にマイクロコンピュータ断層撮影 (μ CT) にて埋入組織周辺の石灰化挙動を観察した。PIO 内包ゼラチンハイドロゲルにおいて、石灰化は観察されなかったが、複合体においては、埋入 14 日後に埋入部位周辺で石灰化が観察された。

研究開発項目 4: 最適化複合体による骨再生誘導 (日本と英国で共同実施)

最適化複合体を得るためには、複合体に含まれる PIO 量および生体活性ナノクレイ量がマクロファージ分極化に与える影響を系統的に評価し、PIO 徐放化が生体活性ナノクレイによる異所性骨形成挙動に与える影響を、マクロファージの分極化および骨形成速度の観点から検証する必要がある。しかしながら、研究開発期間終了時点でその途中段階であるため、最適化複合体による骨再生誘導には着手できていない。

【英文】

Objective of this project

There are two approaches in regenerative therapy: One is the cell transplantation therapy, the other is the regeneration induction therapy utilizing endogenous cells. It is important to control the microenvironment to be regenerated in both approaches. Recently, it has been well recognized that the inflammation process is tightly related to the regeneration and repair of biological tissue. Although the inflammation is initially required for the tissue regeneration and repair, the continuous and chronic inflammation often impairs the tissue regeneration and repair. Therefore, it is indispensable to recruit the endogenous stem cells to terminate the inflammation in the site to be regenerated toward the effective induction of tissue regeneration and repair. It is well known that macrophages are involved in the entire inflammation process and possess two contrary phenotypes of “pro-inflammatory” and “anti-inflammatory” to modulate the inflammation process. Through the tight

Japan-UK collaboration, this project was attempted to create a novel composite which enables to recruit the endogenous stem cells and induce the anti-inflammatory phenotype of macrophages based on the fusion of each original biomaterial technology (gelatin hydrogel and bioactive nanoclays) and aim at the efficient induction and elucidation of bone regeneration. The following studies were planned and carried out in this project.

1. Elucidation of nanoclay-macrophages interaction (UK)
2. Preparation of composite and evaluation of interaction with macrophages (Japan)
3. Influence of composite on macrophages-stem cells crosstalk (UK)
4. Evaluation of optimized macrophage modulation strategy for bone tissue regeneration (Japan & UK)

Achievements of this project

- (1) A one-step novel method to prepare gelatin hydrogel incorporating pioglitazone (PIO)

So far, the controlled release of PIO with the poor water solubility by gelatin hydrogel has required the complicated procedures which include the water solubilization of PIO by gelatin micelle formation and the incorporation of water-solubilized PIO in the gelatin hydrogel. In this project, the incorporation of PIO in the gelatin hydrogel was achieved by directly adding PIO dissolved in methanol or hydrochloric acid into the gelatin hydrogel through the immobilization of PIO by making use of amphiphilic nature of gelatin chain in hydrogel. The in vitro study confirmed that the PIO was incorporated into the hydrogel by this method and released accompanied by the hydrogel degradation.

- (2) Evaluation of macrophage polarization by PIO released from gelatin hydrogel

Bone marrow cells were isolated from mice and differentiated into macrophages by culturing with the medium including macrophage colony stimulating factor. Bone marrow-derived macrophages were cultured with the medium including lipopolysaccharide and interferon- γ to obtain the M1 macrophages. The M1 macrophages were cultured with PIO released from gelatin hydrogel and the amount of tumor necrosis factor (TNF)- α was measured. The production of TNF- α from M1 macrophages was significantly suppressed by PIO, while the suppression extent by PIO released from gelatin hydrogel sponge was similar to that of free PIO. This result indicates that the PIO released has the polarization activity.

- (3) Evaluation of in vivo degradation of gelatin hydrogel incorporating PIO

The gelatin hydrogel with or without PIO incorporation by the novel method was subcutaneously implanted into the back of mice and the tissue appearance of hydrogel was observed. The in vivo degradation of sponges depended on the crosslinking condition, but was not influenced by the PIO incorporation. Next, tissue appearance was observed after subcutaneous implantation of the gelatin hydrogel incorporating PIO or the composite of bioactive nanoclay. The degradation of hydrogel was slightly retarded by the presence of bioactive nanoclay.

- (4) Ectopic bone formation by the composite implantation

The gelatin hydrogel incorporating PIO or the composite of bioactive nanoclay was subcutaneously implanted into the back of mice. The calcification surrounding the implanted tissue was detected by the micro computed tomography 7 and 14 days after implantation. The calcification was observed in the subcutis 14 days after implantation of composites.