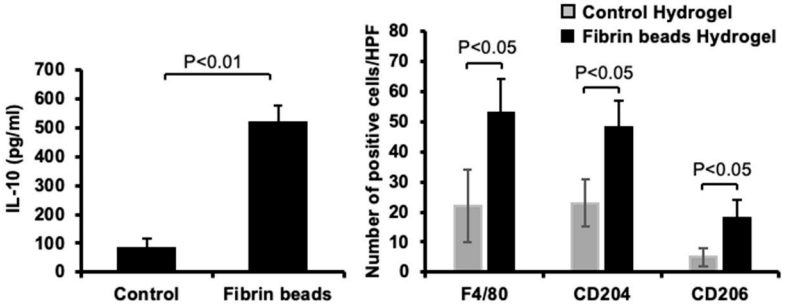
90　抗炎症性マクロファージを誘導する再生医療材料の開発	藤原　章雄

【目的】マクロファージ（Mφ）は活性化の違いにより炎症惹起性の古典活性化 Mφ（M1 Mφ）と抗炎症性・組織修復性のオルタナティブ活性化 Mφ（M2 Mφ）の 2 種類に大別される。また、Mφ の起源は、卵黄嚢由来・組織在住 Mφ と骨髄・単球由来 Mφ の 2 種類に大別される。現在、M1／M2 Mφ を区別するマーカー分子は存在するが Mφ の起源を正確に区別するマーカー分子はないことから、起源の違いによる Mφ の機能的違いや各疾患に対する役割については未解明である。近年、M2 Mφ を組織幹細胞と共に動員する薬剤のハイドロゲル局所徐放化技術による組織幹細胞の再生・組織構築能を向上させるバイオマテリアル開発が行われているが、起源の違う 2 種類のどちらの M2 Mφ を動員すべきかは明確ではない。Mφ 特異的分子である CD163 は M2 Mφ の代表的な細胞表面マーカーであり、CD163 陽性 Mφ が強い組織修復能を有すると共に臓器に常在していることが知られている。ゆえに、CD163 が卵黄嚢由来・組織在住 Mφ のマーカーになりうる可能性や組織再生バイオマテリアル開発において動員すべき M2 Mφ は CD163 陽性 Mφ である可能性を考えた。そこで、本研究では Mφ の CD163 に着目したマウスにおける卵黄嚢・組織在住 Mφ の分布と単球由来 Mφ との機能差異を解析し、マウスとヒトにおける CD163 陽性 Mφ の優れた組織修復能を明らかにすることで、その促進的制御による再生医療材料への応用を目指した基礎的知見を得ることを目的とした。

【方法】Mφ としてはヒト単球由来 Mφ、マウス骨髄由来 Mφ ならびにマウス腹腔 Mφ を用い、組織としてはマウス自然発生多重がん組織および、クロドロン酸リポソームにて Mφ を除去したマウス肝臓組織を用いて CD163 の発現をウエスタンブロット、Cell-ELSA、免疫細胞染色、免疫組織染色にて解析した。また、フィブリンビーズ（FB）や FB 含有ハイドロゲル、kakkalide 含有ハイドロゲルの Mφ に対する作用をマーカー（CD163、CD204、CD206、IL-10、TNF-α等）の発現・分泌をウエスタンブロット、ELISA、qPCR、免疫細胞染色、免疫組織染色にて解析することで評価した。

【結果】マウス骨髄由来 Mφ には CD163 の発現は認められず、マウス腹腔 Mφ では発現が認められた。また、マウスに自然発生した多重がん組織（Hepatoma と Histiocytic sarcoma）では、肝細胞に由来するがんである Hepatoma の組織では CD163 陽性 Mφ は認められず、肝在住の Mφ であるクッパー細胞に由来するがんである Histiocytic sarcoma の組織では CD163 陽性 Mφ が認められた。さらに、クロドロン酸リポソームにて臓器（肝臓）中の組織在住の Mφ を一時的に除去し、骨髄・単球から供給される Mφ の CD163 発現を解析したところ CD163 陰性であり、マウス胎仔組織の卵黄嚢に存在する Mφ では CD163 陽性であったことから、マウスでは CD163 が卵黄嚢由来・組織在住 Mφ のマーカーになりうることが示唆された。また、フィブリンビーズ（FB）は Mφ に対して抗炎症マーカー（CD163、CD206、IL-10 等）の発現・分泌を誘導し、LPS による炎症刺激に対しては炎症マーカーである TNF-α の分泌を抑制したことから、FB は Mφ を抗炎症性のフェノタイプに誘導することを明らかにした。さらに、FB 含有ハイドロゲルを移植したマウスではハイドロゲル中に浸潤する Mφ が顕著に増加すると共に抗炎症性の M2 Mφ が増加していた。ゆえに、FB 含有ハイドロゲルは *in vivo* でも Mφ の抗炎症性フェノタイプを誘導する効果を持つ有用な組織再生バイオマテリアルとなりうる可能性が示唆された。

マクロファージを抗炎症性フェノタイプへ誘導するフィブリンビーズ



90. 抗炎症性マクロファージを誘導する再生医療材料の開発

藤原　章雄

熊本大学 大学院生命科学研究部 細胞病理学講座

Key words：マクロファージ，CD163，バイオマテリアル，抗炎症，フィブリンビーズ

緒　言

マクロファージ（Mφ）は活性化の違いにより炎症惹起性に機能する古典活性化 Mφ（M1 Mφ）と抗炎症性・組織修復性に機能するオルタナティブ活性化 Mφ（M2 Mφ）の 2 種類に大別される。また、Mφ の起源は、卵黄嚢由来（Yolk-sac）・組織在住（Resident）Mφ と骨髄（Bone marrow）・単球（Monocyte）由来 Mφ の 2 種類に大別される。現在、Mφ を区別するマーカー分子は存在するが、起源の異なる Mφ を正確に区別するためのマーカー分子が見つかっておらず、結果として、体内分布や機能的住み分け、各疾患に対する役割の詳細は分かっていない。また、前述の理論は卵黄嚢由来・組織在住 Mφ が提唱される以前の分類であり、卵黄嚢由来・組織在住 Mφ への適応の可否についての結論は出ていない。近年、M2 Mφ を組織幹細胞と共に動員する薬剤のハイドロゲル局所徐放化技術を用いて組織幹細胞の再生・組織構築能を向上させるバイオマテリアル開発が行われているが、具体的に上記 2 種類のどちらの M2 Mφ を動員すべきか明らかになっていない。CD163 は M2 Mφ の代表的な細胞表面マーカーとして知られていると共に CD163 陽性 Mφ は強い組織修復能を有することが知られている。さらに、CD163 陽性 Mφ は臓器に常在していることから、病態形成に初期から関与していると考えられる。一方で、腫瘍内や炎症臓器に増加する Mφ は単球由来であることが報告されていることから、CD163 が卵黄嚢由来・組織在住 Mφ のマーカーになりうる可能性や組織再生バイオマテリアル開発において動員すべき M2 Mφ は CD163 陽性 Mφ である可能性が考えられた。そこで、本研究では Mφ の CD163 に着目したマウスにおける卵黄嚢・組織在住 Mφ の分布と単球由来 Mφ との機能差異を解析し、マウスとヒトにおける CD163 陽性 Mφ の優れた組織修復能を *in vivo* 及び *in vitro* で詳細に明らかにすることで、その促進的制御による再生医療への応用のための基礎的知見を得ることを目的とした。

方法および結果

1. CD163 はマウスにおいて組織在住マクロファージのマーカーとなりうる。

CD163 は単球・Mφ に発現するヘモグロビンスカベンジャー受容体でヘモグロビン - ハプトグロビン複合体の処理を行なっているとされる［1］。ヒトの Mφ における CD163 発現は、他の Mφ 表面分子と異なり、抗炎症性サイトカイン刺激で上昇し、炎症性サイトカインでは低下するという比較的明確な発現誘導パターンを示すため、上述の Mφ 活性化機構において、CD163 は M2 Mφ マーカーとして認知され頻用されている。また、一般的に病態発症後に組織において短期間で増加する Mφ の由来としては末梢血単球が浸潤し Mφ へ分化した骨髄・単球由来 Mφ であると知られている。ゆえに、腫瘍組織においても多くの腫瘍内浸潤 Mφ の存在が認められている。一方で、図 1a に示す免疫組織染色の結果にて示すように、腫瘍内に浸潤する CD163 陽性 Mφ に着目すると、ヒト腫瘍組織においては CD163 陽性 Mφ が腫瘍中心部まで浸潤していたのに対して、マウスの腫瘍組織では CD163 陽性 Mφ は腫瘍辺縁～境界部皮下組織に偏在し、中心部にはほとんど認められなかった（図 1a）。ゆえに、ヒトの骨髄・単球由来 Mφ は CD163 を発現するのに対してマウスの骨髄・単球由来 Mφ は CD163 を発現していないと仮説を立て検証を行った。まず、マウスを用いて骨髄由来 Mφ および、組織在住 Mφ として知られる腹腔 Mφ を調整し、CD163 の発現をウエスタンブロット、qPCR、免疫細胞染色にて解析を行ったところ、いずれの解析においても骨髄由来 Mφ には CD163 の発現は認められ

なかった（図 1b）。一方で、これまでの報告にあるようにヒト単球由来 Mφ では CD163 の発現が認められた（図 1c）。また、マウスに自然発生した多重がん組織（Hepatoma と Histiocytic sarcoma）を用いて免疫染色を行ったところ、肝細胞に由来するがんである Hepatoma の組織では CD163 陽性 Mφ は認められず、肝在住の Mφ であるクッパー細胞に由来するがんである Histiocytic sarcoma の組織では CD163 陽性 Mφ が認められた（図 1d）。さらに、生体内の Mφ を高効率に除去できるクロドロン酸リポソームを用いて、臓器（肝臓）中の組織在住の Mφ を一時的に除去し、骨髄・単球から供給されることで、臓器で回復する Mφ における CD163 発現を解析したところ、それら Mφ では CD163 陰性であった（図 1e）。加えて、マウス胎仔組織を用いて、卵黄嚢に存在する Mφ における CD163 発現を解析したところ CD163 陽性であったことから（図 1f）、マウスにおいては CD163 が卵黄嚢由来・組織在住 Mφ のマーカーになりうることが示唆された。

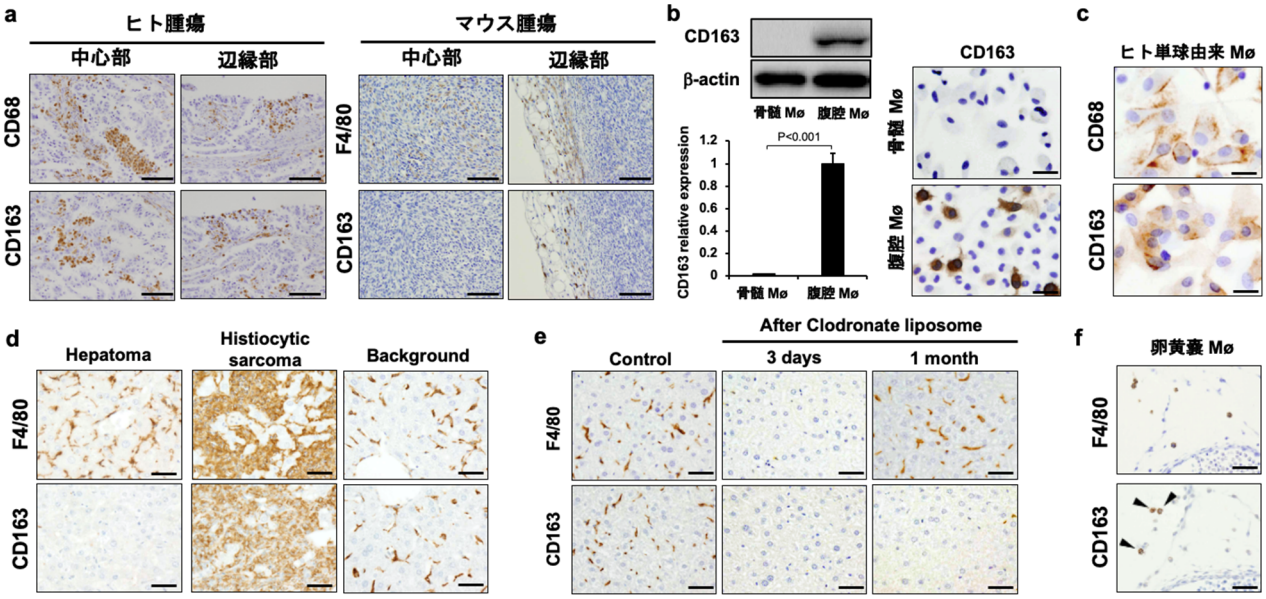


図 1. マウスにおける組織在住マクロファージマーカーとしての CD163 の解析

a) ヒト腫瘍組織（卵巣癌）およびマウス腫瘍組織（骨肉腫）における汎 Mφ マーカー（CD68、F4/80）と CD163 の発現（スケールバー：100 μm）。

b) 骨髄由来 Mφ ならびに腹腔 Mφ における CD163 の発現（Mann-Whitney U test）（スケールバー：20 μm）。

c) ヒト単球由来 Mφ における CD163 の発現（スケールバー：50 μm）。

d) マウス自然発生多重がん組織における汎 Mφ マーカー（F4/80）と CD163 の発現（スケールバー：50 μm）。

e) クロドロン酸処置後のマウス肝臓における汎 Mφ マーカー（F4/80）と CD163 の発現（スケールバー：50 μm）。

f) マウス卵黄嚢における汎 Mφ マーカー（F4/80）と CD163 の発現（スケールバー：50 μm）。

2. フィブリンビーズはマクロファージを抗炎症性のフェノタイプに誘導する。

これまでに我々はフィブリンゲルが Mφ の活性化状態を抗炎症性にシフトさせることを明らかにした［2］。また、我々は様々な粒子径の粒子を Mφ に添加すると、Mφ の特性である貪食能が発揮され効率的に粒子を取り込むと共に、特定の粒子径の粒子のみが Mφ の活性化に影響を与えることを明らかにしている。ゆえに、我々は粒子化したフィブリンであるフィブリンビーズは効率的に Mφ に取り込まれることで Mφ を抗炎症性のフェノタイプに誘導し、再生医療材料に応用できる生物分解性の医療材料を実現できるのではないかと着想した。そこで、まずフィブリンビーズの Mφ の活性化に対する作用を検討した。ヒト末梢血単球由来 Mφ にフィブリンビーズを添加し、培養液中に分泌される抗炎症性サイトカインである IL-10 を ELISA にて検出したところフィブリンビーズの添加により IL-10 の分泌が増加した

（図 2a）。また、Cell-ELISA にて CD163 の発現に対する作用を評価したところ、フィブリンビーズにより CD163 の発現増加も認められた（図 2b）。さらに、qPCR を用いた解析においてもフィブリンビーズ刺激により抗炎症性マーカー（CD163、CD206）の増加が認められた（図 2c）。そこで、次に LPS にて炎症を惹起させた条件下におけるフィブリンビーズによる炎症抑制作用を培養液中の TNF-α の分泌量を ELISA にて測定することで評価したところ、フィブリンビーズ添加群では、LPS 刺激により増加した TNF-α の分泌が低下した（図 2d）。さらに、これらヒト単球由来 Mφ で認められたフィブリンビーズによる抗炎症作用はマウス腹腔 Mφ を用いた検討においても同様に認められた（図 2e、f）。ゆえに、フィブリンビーズは Mφ を抗炎症性のフェノタイプに誘導することが明らかとなった。

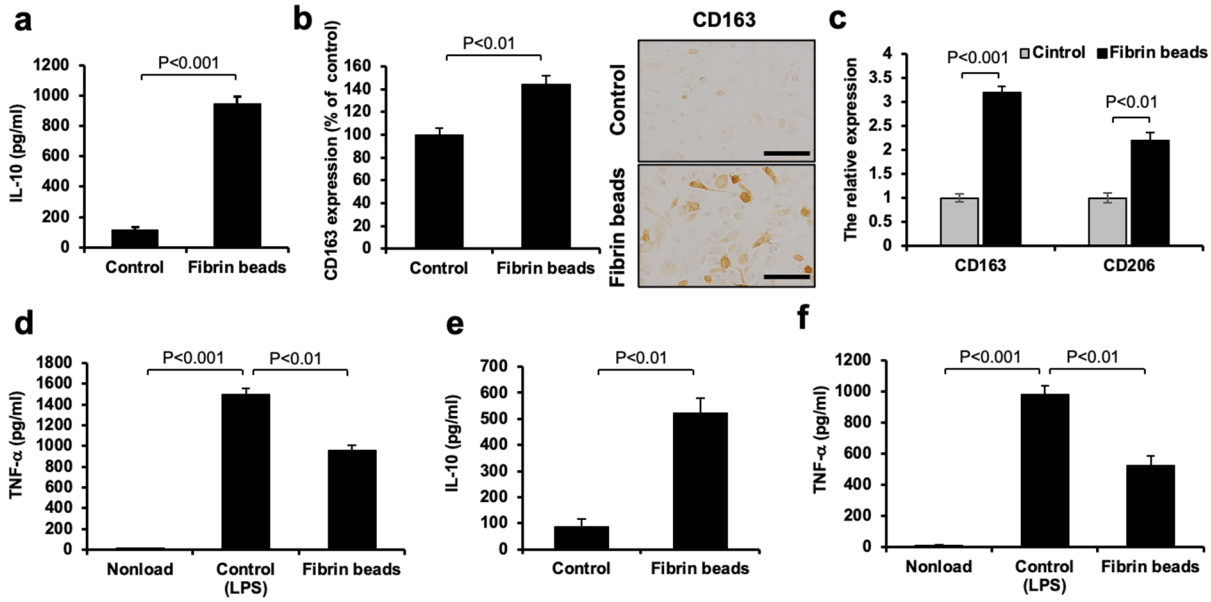


図 2. マクロファージにおけるフィブリンビーズの抗炎症作用

a） ヒト末梢血単球由来 Mφ における IL-10 分泌（Mann-Whitney U test）。

b） ヒト末梢血単球由来 Mφ における CD163 の発現（Mann-Whitney U test）（スケールバー：100μm）。

c） ヒト末梢血単球由来 Mφ における CD163、CD206 の遺伝子発現（Mann-Whitney U test）。

d） ヒト末梢血単球由来 Mφ における TNF-α の分泌（Mann-Whitney U test）。

e） マウス腹腔 Mφ における IL-10 の分泌（Mann-Whitney U test）。

f） マウス腹腔 Mφ における TNF-α の分泌（Mann-Whitney U test）。

3. フィブリンビーズ含有ハイドロゲルや kakkalide 含有ハイドロゲルはマクロファージをハイドロゲル内に呼び込み抗炎症性のフェノタイプに変化させる。

上記の通り、我々はフィブリンゲルが Mφ の活性化状態を抗炎症性にシフトさせることを明らかにし、また、これまでに天然化合物である kakkalide も抗炎症性の Mφ に誘導することを明らかにしている。そこで、フィブリンビーズおよび kakkalide を含有するハイドロゲルのバイオマテリアルとしての有効性をさらに証明するために、現在、主要なバイオマテリアルであるゼラチンハイドロゲルを用いて、フィブリンビーズならびに kakkalide を含有するゼラチンハイドロゲルを作製し、それらハイドロゲルの Mφ 対する作用を評価した。作製したハイドロゲル上にヒト末梢血単球由来 Mφ を播種し、24 時間培養後の培地中に分泌される IL-10（抗炎症性サイトカイン）および、CCL2（マクロファージ遊走因子）を ELISA にて測定したところ、フィブリンビーズおよび kakkalide を含有するゼラチンハイドロゲル共に、IL-10 の分泌は促進した（図 3a）。一方、CCL2 の分泌はフィブリンビーズを含有するハイドロゲルにて顕著に増加したことから（図 3a）、フィブリンビーズを含有するハイドロゲルは Mφ を呼び込む能力が高いと共に、より多くの Mφ を抗炎症性のフェノタイプに誘導する可能性が示唆された。そこで、フィブリンビーズ含有ハイドロゲルのバイオ

マテリアルとしての有効性をさらに証明するために、マウスへの移植モデルを用いて検討を行った。免疫組織化学的解析により、移植したフィブリンビーズ含有ハイドロゲル（Fibrin beads Hydrogel）では、ゼラチンハイドロゲル（Control Hydrogel）に比較して Mφ の浸潤が顕著に認められ（図 3b、c）、M2 マーカーである CD204 陽性、CD206 陽性の Mφ 数も有意に増加していた（図 3b、c）。また、フィブリンビーズ含有ハイドロゲルに浸潤する Mφ は免疫チェックポイント分子である PD-L1 陽性でもあったことから炎症抑制（免疫抑制）的に機能していることが示唆された（図 3d）。また、qPCR での解析でも、フィブリンビーズ含有ハイドロゲル中の浸潤細胞の単球／マクロファージ特異的遺伝子発現レベルが、ゼラチンハイドロゲルの発現レベルよりも高く（図 3e）、抗炎症性の M2 Mφ マーカーである CD163、CD204、CD206、Arg1、Ym1 の遺伝子発現も有意に高かった（図 3f）。ゆえにフィブリンビーズ含有ハイドロゲルは *in vivo* でも Mφ の抗炎症性フェノタイプを誘導する効果を持つ有用な組織再生バイオマテリアルとなりうる可能性が示唆された。

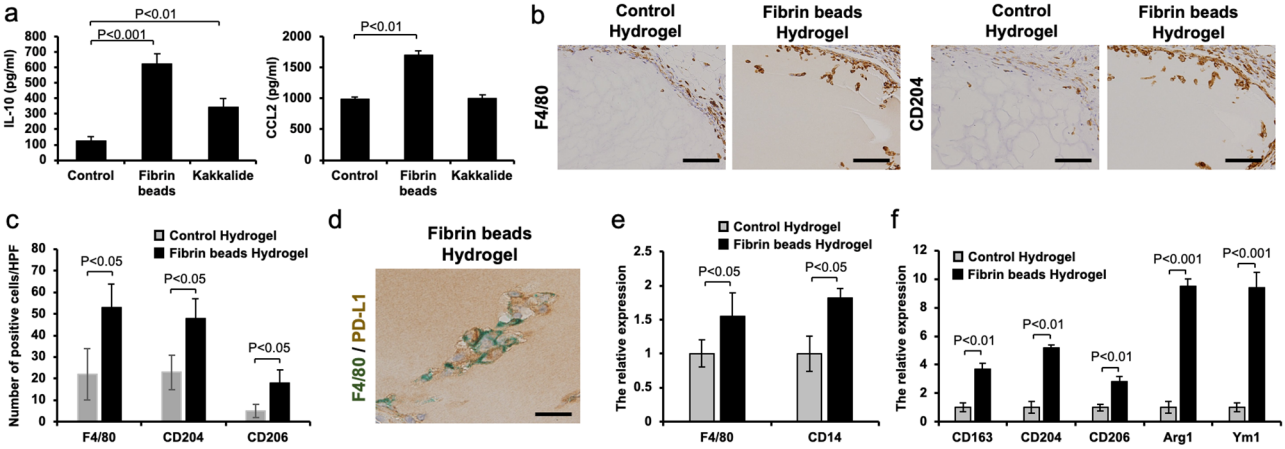


図 3. フィブリンビーズ含有ハイドロゲルの抗炎症作用

a） ヒト末梢血単球由来 Mφ における IL-10 および CCL2 の分泌（Kruskal-Wallis test）。

b） マウス移植モデルにおけるハイドロゲルへの Mφ の浸潤（スケールバー：100 μm）。

c） マウス移植モデルにおけるハイドロゲルへ浸潤した Mφ の F4/80、CD204 および CD206 陽性細胞数（Mann-Whitney U test）。

d） フィブリンビーズ含有ハイドロゲルに浸潤した Mφ における PD-L1 の発現（スケールバー：20 μm）。

e） マウス移植モデルにおけるハイドロゲル浸潤細胞の Mφ 特異的遺伝子（F4/80、CD14）発現（Mann-Whitney U test）。

f） マウス移植モデルにおけるハイドロゲル浸潤 Mφ の M2 マーカー遺伝子（CD163、CD204、CD206、Arg1、Ym1）の発現（Mann-Whitney U test）。

考　察

組織損傷に対する免疫応答は、組織再生スピードを決定するのに重要である。Mφ は、その可塑的な活性化変化および持続的なサイトカイン分泌により免疫系の調節における重要なレギュレーターと考えられている［3, 4］。フィブリンビーズで Mφ を刺激すると、図 2a に示すように、Mφ から抗炎症性サイトカインが分泌される。ゆえに、本研究の仮説は、「フィブリンビーズを含有した生体材料を用いて抗炎症性 Mφ を損傷部位または欠損部位に動員すると炎症を抑制し再生を促進することができる」というものであった。フィブリンビーズ含有ハイドロゲルに浸潤した細胞数は、ゼラチンハイドロゲルに浸潤した細胞数よりも有意に多かった（図 3b、c）。フィブリンビーズ含有ハイドロゲルに浸潤した細胞の多くは、抗炎症性（M2）Mφ マーカーである CD163、CD204、CD206 を発現している Mφ であった（図 3c）。CD163 陽性 Mφ は、腫瘍の増殖を促進することが知られており、また可溶型との間で炎症性疾患の協力を

抑制することが知られている［5, 6］。また、フィブリンビーズ含有ハイドロゲルに浸潤し、周辺組織に存在する細胞では、Arg1、Ym1 の M2 マーカー遺伝子の発現が有意に上昇していたことからフィブリンビーズ含有ハイドロゲルには抗炎症反応があることが強く示唆された（図 3f）。これらの結果は、フィブリンが *in vivo* で Mφ の動員や抗炎症性分極を生来的に誘導することを示唆している．生体材料移植時に観察される免疫反応である異物反応（FBR）は、線維化を誘発し、組織再生を遅らせることが知られている［7, 8］。また、抗炎症性 Mφ（M2 Mφ）への活性化制御が FBR の抑制に有効であると報告されていることから［9］、フィブリンビーズ含有ハイドロゲルは医療材料として有用であると考えられる。組織再生バイオマテリアルとしてのフィブリンビーズ含有ハイドロゲルの実用化には、さらに *in vivo* 創傷修復モデル実験とヒト材料のみから調製したフィブリンビーズ含有ハイドロゲルのヒトマクロファージへの生物学的効果の評価が必要である。また、本研究にて天然化合物 kakkalide 含有ハイドロゲルも抗炎症作用を示したため、フィブリンビーズと天然化合物を組み合わせたハイドロゲルによる検討も興味深いと考えられ、今後の検討課題である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、熊本大学大学院生命科学研究部の菰原義弘教授、鹿児島大学大学院理工学研究科の武井孝行教授、熊本大学大学院先端科学研究部の西東洋一特任助教である。共同研究を遂行するにあたり、多大なるご協力を頂きました。御礼申し上げます。

文　献

1) Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature. 2001 Jan 11;409(6817):198-201. doi: 10.1038/35051594. PMID: 11196644

2) Tanaka R, Saito Y, Fujiwara Y, Jo J, Tabata Y. Preparation of fibrin hydrogels to promote the recruitment of anti-inflammatory macrophages. Acta Biomater. 2019 Apr 15;89:152-165. doi: 10.1016/j.actbio.2019.03.011. Epub 2019 Mar 9. PMID: 30862554

3) Ziemba AM, Gilbert RJ. Biomaterials for Local, Controlled Drug Delivery to the Injured Spinal Cord. Front Pharmacol. 2017 May 10;8:245. doi: 10.3389/fphar.2017.00245. eCollection 2017. PMID: 28539887 例、Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024. PMID: 16904174

4) Mouriño V, Boccaccini AR. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. J R Soc Interface. 2010 Feb 6;7(43):209-27. doi: 10.1098/rsif.2009.0379. Epub 2009 Oct 28. PMID: 19864265

5) Komohara Y, Niino D, Saito Y, Ohnishi K, Horlad H, Ohshima K, Takeya M. Clinical significance of CD163$^+$ tumor-associated macrophages in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. Cancer Sci. 2013 Jul;104(7):945-51. doi: 10.1111/cas.12167. Epub 2013 May 9. PMID: 23557330

6) Shiraishi D, Fujiwara Y, Horlad H, Saito Y, Iriki T, Tsuboki J, Cheng P, Nakagata N, Mizuta H, Bekki H, Nakashima Y, Oda Y, Takeya M, Komohara Y. CD163 Is Required for Protumoral Activation of Macrophages in Human and Murine Sarcoma. Cancer Res. 2018 Jun 15;78(12):3255-3266. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2011. Epub 2018 Apr 2. PMID: 29610117

7) Saleh LS, Carles-Carner M, Bryant SJ. The in vitro effects of macrophages on the osteogenic capabilities of MC3T3-E1 cells encapsulated in a biomimetic poly(ethylene glycol) hydrogel. Acta Biomater. 2018 Apr 15;71:37-48. doi: 10.1016/j.actbio.2018.02.026. Epub 2018 Mar 2. PMID: 29505890

8) Delgado LM, Bayon Y, Pandit A, Zeugolis DI. To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices. Tissue Eng Part B Rev. 2015 Jun;21(3):298-313. doi: 10.1089/ten.TEB.2014.0290. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25517923

9) Mesure L, De Visscher G, Vranken I, Lebacq A, Flameng W. Gene expression study of monocytes/macrophages during early foreign body reaction and identification of potential precursors of myofibroblasts.PLoS One. 2010 Sep 23;5(9):e12949. doi: 10.1371/journal.pone.0012949.PMID: 20886081