

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10071

研究課題名(和文)細胞外マトリックスを標的とする新たな治療技術の開発

研究課題名(英文)Development of the new therapeutic strategy which targeted an extracellular matrix

研究代表者

住吉 秀明 (SUMIYOSHI, Hideaki)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：60343357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、作用候補因子を配合した人工細胞外マトリックス(ECM)を作製し、それを体内に移植しECMの中より、創傷治癒に伴うECMの再構築や細胞の振る舞いに影響を与える薬効分子を探索する試みである。この研究の成果としてミズクラゲ (*Aurelia aurita*) コラーゲンに再上皮化と肉芽形成両方を促進するはたらきが見出され、最終的にその生物効果を最大限発揮できる様に最適化した人工真皮を作製した。これは将来的に創傷をより綺麗に修復できる新たな生体素材として研究を継続している。この実例によって埋め込み型人工ECMを用いた生体作用分子探索の試みは成功したとすることができる。

研究成果の概要(英文)：Extracellular matrix (ECM) is the external environment for cells. ECM is a complex of a large number of high polymer proteins, and a total of these interactions become the function, and it complicate a study. In our study, we have developed an artificial ECM that contained the type I collagen fiber structure and additional test molecule to evaluate the bio effects within ECM in transplanted conditions. As the result, we have developed a novel artificial dermis containing jellyfish (*Aurelia aurita*) collagen that accelerated skin regeneration through both re-epithelialization and granulation tissue formation. The artificial dermis was prepared as a mixture of porcine type I collagen and jellyfish collagen. The effect was evaluated in vivo using the skin full-thickness wound mouse model. Experiments are in progress to demonstrate that accelerate cleaner dermal healing without scar formation when used with additional time span. It could say that the trial was done successfully.

研究分野：分子生物学・生化学

キーワード：細胞外マトリックス 分子探索 ミズクラゲコラーゲン 再生医療 バイオマトリックス 人工真皮
再上皮化 肉芽形成

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス (以下 ECM) は組織の基礎構築と治癒・再生または組織線維化などの病態形成の環境を形成する。その実体は多種類の高分子タンパク質の相互作用の総和であり、単体成分の精製と解析を以て ECM 全体の機能を解釈することや、医療応用への適用を難しくしている。我々の先行実験においても、希少コラーゲン V 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖を精製し、線維化抑制と癒着防止に役立てる企画を試みたが、機能を保持した $\alpha 3$ 鎖を含む V 型コラーゲンを充分量抽出し、投与することが実現出来なかった (基盤研究 C:21591672)。

そこで本研究では考え方を換え、最初から生体の ECM を模倣したコラーゲンスポンジに試験される薬剤を配合した人工 ECM を作製し、これをマウスに移植して、生体内での人工マトリックスの振る舞いを観察することで、試験される薬剤がマトリックスから細胞や細胞外環境に働きかける実験系を考えた。先行実験により、コラーゲンをフィルムやスポンジに加工する手法は確立されていたので、本実験では移植モデルの形式 (皮下埋設、体腔内、人工皮膚) によって形状を最適化することから取り組まれた。試験される薬剤の候補としては、これまで研究対象として用いていた V 型コラーゲンから始められ、後に化粧品や食品に広く用いられている海洋性コラーゲンにも広げられた。本実験は本来、ECM 環境下で抗線維化活性を持つ薬剤候補を見出す狙いがあったが、後述に示すように皮膚の自己再生を活性化する成分がミズクラゲコラーゲンから見出されるという予想外の成果が見出されるに至った。

2. 研究の目的

【平成 27 年度】

人工 ECM 作製と動物移植実験モデル確立: 実験計画のデザインとなる人工 ECM のプロトタイプを作製し、マウス体内の移植実験とサンプルの回収、組織学的評価の一連のサイクルを完成させた。試験薬剤候補としてブタ胎盤由来 V 型コラーゲンとミズクラゲコラーゲンをを用いた。

【平成 28 年度】

人工 ECM を人工皮膚仕様にする: 実験により、ミズクラゲコラーゲンに皮膚再生促進活性が見出された。人工 ECM を人工皮膚試験

仕様とし、結果を受けて再生促進効果を最大化する構造へと順次、作製改変を行なった。

表皮再上皮化と遊走細胞数の評価法設定:

ミズクラゲコラーゲンによる皮膚再生効果の確認するための解析基準を決定した。

【平成 29 年度】

新型人工皮膚の評価: 最終決定されたミズクラゲコラーゲン配合人工皮膚の有益性を創傷動物モデルへの移植実験により解析した。

再上皮化促進作用の生物学的機序解明: ヒト初代表皮角化細胞を用いての *in vitro* 実験系により生物学的効果の裏付けを行なった。

3. 研究の方法

【平成 27 年度】

(1) **人工 ECM 担体の作製:** ブタ皮膚 I 型アテロコラーゲンをベースとして、ブタ V 型コラーゲンやミズクラゲコラーゲンを配合したフィルムとスポンジの試作品を作製した。

(2) **電顕レベルの構造解析と生体移植実験:** 人工 ECM の機能を試験した。走査電顕で ECM の微細構造を精査した。皮内、皮下、体腔内へ生体移植実験が行われ、短期 (6 日) の移植片の器質的変化や宿主細胞への影響が読み取れるか組織的観察を行なった。

【平成 28 年度】

(3) **人工皮膚仕様試作品作製:** 実験によりミズクラゲコラーゲンは 45% の配合率、フィルム形態で再上皮化、スポンジ形態で細胞遊走が促進されるため、スポンジ表面にフィルムをコーティングする加工法を開発した。

(4) **再上皮化・細胞遊走活性の評価:** 宿主上皮の伸長と ECM 内への進入細胞数を画像解析で計測し、統計学的有意性を評価した。その上で最適添加量を決定し、上記(3)の作製条件へのフィードバックを行なった。

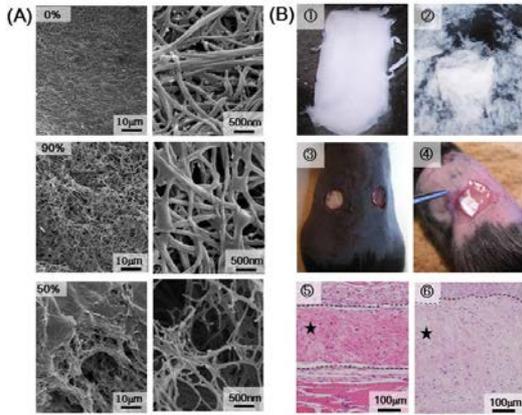
【平成 29 年度】

(5) **新型人工皮膚の評価:** 作製された新型人工皮膚を、創傷モデルマウスに移植し、6 日間 (短期)、3 週間 (長期) 後のサンプルを組織学的に解析して再上皮化、細胞遊走、宿主の組織再構築を評価した。

(6) ***in vitro* 実験系による再上皮化促進作用の機序解明:** ヒト初代表皮角化細胞を用いる実験系を立ち上げ、ミズクラゲコラーゲン添加によって遊走 (scratch assay) 増殖、(cell counting assay)、遺伝子発現 (real-time PCR assay) に与える変化を調べた。

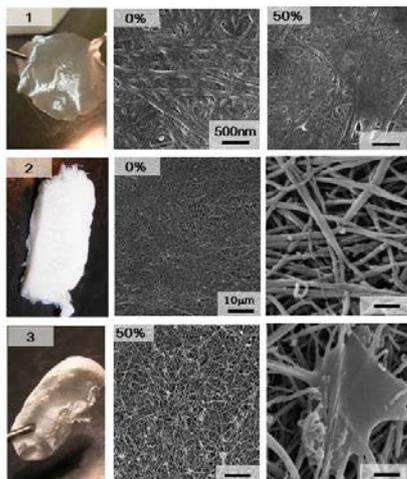
4. 研究成果

図1. 人工 ECM 作製と *in vivo* 実験系の確立



人工 ECM は、ブタ I 型コラーゲンに V 型コラーゲンを作用因子候補として配合したものをプロトタイプとした。V 型コラーゲンは線維形成を阻害する作用があり 50%の配合比では線維構築が不完全となり (図 1 A) ECM 構造を持つ固形物が形成されなかった (図 1 B ②)。これらを人工真皮③、皮下充填材④として生体内に留置し、人工 ECM によってもたらされる生体の変化を観察する実験系を確立した。図 B⑤ ⑥は 100% I 型コラーゲンと 20% V 型コラーゲン ECM の皮下移植 6 日経過事例を示す。★印で示す人工 ECM 内部において、ECM の質的变化や侵入した細胞の種類・個数の差異は見られなかった。

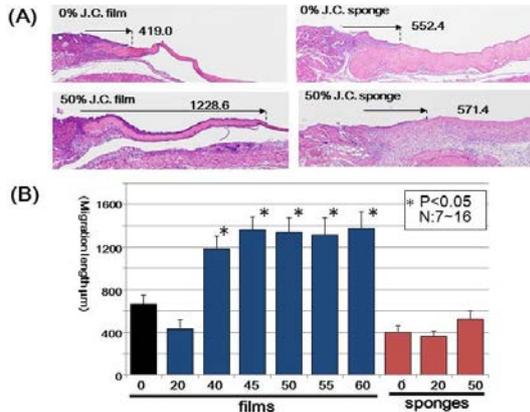
図2. ミズクラゲコラーゲンの人工 ECM



プロトタイプ人工 ECM を先行例として、作用因子候補としてミズクラゲコラーゲン (以下 J.C. と表記) を配合した作製事例を図 2 に示す。フィルム 1 とスポンジ 2, 3 の外見に J.C. の有無による差はなかった。SEM による超微細構造観察では J.C. は線維構造

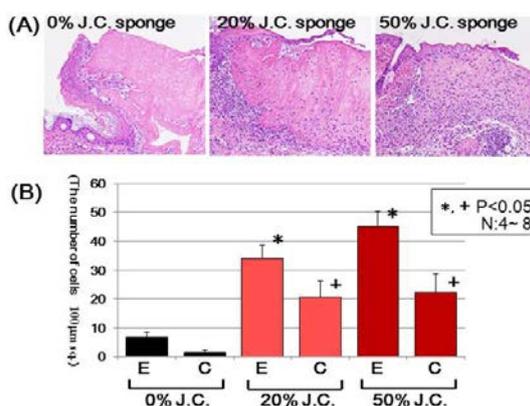
を構築せずブタコラーゲン線維の隙間を埋める構造となり、ブタコラーゲンの線維構築を阻害せず、コラーゲン直径や走行は保持されている事が観察された。

図3. ミズクラゲコラーゲンを配合したフィルム成型体は表皮角化細胞の再上皮化を促進する



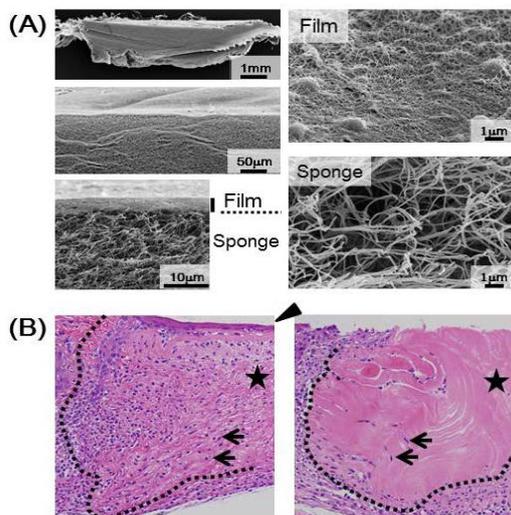
作用因子候補としての J.C. を含む人工 ECM の *in vivo* 解析を行なった結果、人工真皮モデル実験において、通常のコラーゲンフィルムには見られない再上皮化促進作用が認められた。面白いことにこの効果はフィルム形状でのみ有効であった (図 3A)。実験例を増やし、J.C. 含有量と表皮細胞の伸長距離を画像解析により測定し詳細に調べたところ、J.C. の表皮伸長効果が統計的に有意であることが確認され、スポンジ上では伸長促進が起きないことも確認できた (図 3B)。J.C. の添加量を増量すると、表皮角化細胞の遊走活性は増加するが同時に剥離し易くなる傾向が増すことも示された。組織学的に良好な表皮角化細胞の形態を維持し、その遊走を促進する最適添加量は 40~50% であった。J.C. 50% 以上になると、人工 ECM が不安定になるため、45% を最適濃度として決定した。

図4. ミズクラゲコラーゲンを配合したスポンジ成型体は細胞の ECM への遊走を促進する



先述結果と対称的に J.C.含有の人工 ECM を同様に人工真皮として移植し、ECM 担体内への細胞遊走作用を観察したところ、J.C.の配合により細胞遊走の促進が見られ、それはスポンジ成型体に見られる現象であった。移植 6 日後のスポンジサンプルの組織像を示す (図 4A)。画像解析によって単位面積当たり遊走細胞数を比較した結果 J.C.の細胞遊走促進作用は、コラーゲンスポンジの末端部 E (*), 中央部 C (+) 共に有意であることが確認された。これによって J.C.は再上皮化と肉芽形成両方を促進し、媒体となる構造はフィルム・スポンジと異なることがわかった。

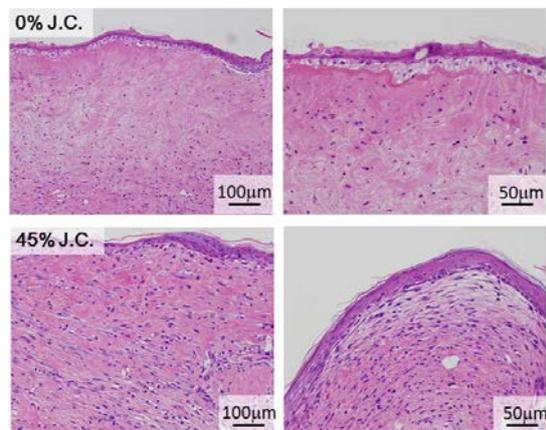
図5. 素材形状の最適化



人工 ECM の加工形状を工夫し、人工真皮として最適な生物活性を示す形状の試作を行なった。再上皮化を促進するためにはフィルム形状、宿主細胞を遊走させ真皮様組織の再構築をさせるためには、コラーゲン線維を再現するスポンジ形状 (t-ブチルアルコール溶媒下凍結乾燥法) が最もよかった。フィルム形状では中に細胞が進入出来ないため、出来るだけ薄い構造に仕上げる必要があった。フィルムとスポンジの単純貼り合わせでは境界に細胞が侵入し両者を剥離させる等の問題が生じた。最終的に表皮側は酸性溶解した 45% J.C. 含有ブタ I 型コラーゲン混合液を線維構築した 45% J.C.コラーゲングルに塗布し、酸性条件による溶融接合を行ない、そのままアルコール固定と t-ブチルアルコール溶媒転換、凍結乾燥することで、極薄のコラーゲンフィルムをコーティングした二層性スポンジ作製した。SEM により確認した構造を示す (図 5A)。細かいネット上構造の

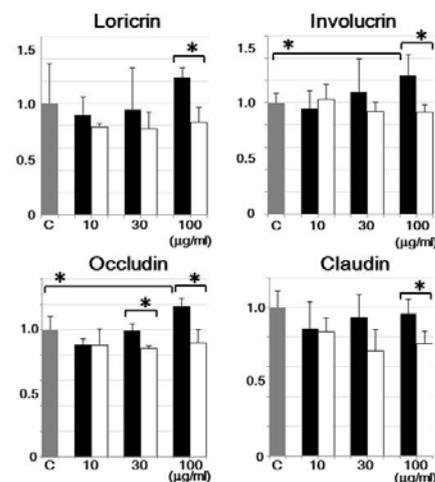
フィルムが上部を、直径 100 nm のコラーゲン線維走行を持つ真皮様コラーゲンスポンジが下部を形成し、フィルムの厚さは乾燥時で 5 μm であった。この新しい人工真皮をマウスの背部皮膚の全層欠損モデルに移植し、6 日経過後の回復をバイオアッセイにて調べた (図 5B)。J.C.を 45%含むサンプルが左側である。J.C.の作用により、表皮角化細胞による再上皮化と宿主細胞の遊走による肉芽形成と真皮様組織構築が同時に起こる人工真皮の開発が確認出来た。

図6. 新しい人工真皮の移植例 3 週間経過後



J.C.を含有した新しい人工皮膚を用いた移植実験の長期経過を検証するため、3 週間後の組織を調べた。その結果、J.C.成分を含む生体材料はブタ I 型コラーゲンのみの従来品より吸収が速く、早期に宿主組織に置換されることがわかった。これは人工皮膚よりも再生促進薬として有益な性状と考えられた。

図7. *in vitro* 実験系によるミズクラゲコラーゲンが表皮細胞に与える効果の検証



ヒト新生児初代表皮角化細胞 NHEK を

用いて、ミズクラゲコラーゲンまたはブタ I 型コラーゲン存在下における表皮の各種階層分化マーカーと細胞接着分子の発現変動を定量的 PCR で比較した。その結果はミズクラゲコラーゲンを添加した群で角化マーカーであるロリクリンとインボルクリン、密着結合構造蛋白質であるオクルディンとクロ-ディンの発現増加が認められた。これは *in vivo* の移植実験で見られた角質化上皮の形成促進とあわせて、ミズクラゲコラーゲンに上皮の角質分化を促進する作用があることを示唆すると考えられた。

考察

本実験計画の発想は ECM の機能を理解する、更には ECM に直接介入して治療効果を及ぼすことができるかどうか、その手段を探すことであった。ECM は複雑な会合体であり、その実体が分子群の相互作用であるのなら、個々の作用分子を精製分離して調べる事は意味を成さないばかりか、精製によってその特性を壊す事になりかねない。

実際の治療に役立てられるアプローチを考える中で、人工マトリックス中に薬効候補分子を混合し、創傷回復における ECM 再構築の現場に巻き込ませて、ECM に直接働きかけて与える変化を見極める方法を考えた。そこにはマトリックス構築に関わる全ての細胞群、ECM 構築分子群が存在し、挿入分子の介入により実際に起こることを事象として捉えることができる筈である。本来の具体的な目的は V 型コラーゲンを挿入分子とし、線維形成過程の阻害を期待して抗線維化・癒着防止作用を検出し、そこから抗線維化薬開発へのきっかけを掴むことであった。

V 型コラーゲンの実験系は期待通りの抗線維化効果を検出できなかったが、V 型コラーゲンに近い構造を持つとされる新しい海洋性コラーゲンであるミズクラゲコラーゲン(以下 J.C.)を本実験系に応用したところ、予想外の皮膚表皮組織の再構築と細胞遊走を促進するという成果を得る事が出来た。

本実験は、挿入分子がもたらす様々な現象に対応するようデザインされており、急遽この生体作用を追求するべく実験系を改変できた。J.C.を作用分子とする人工 ECM をフィルムとスポンジそれぞれの形態による人工皮膚の実験系を立ち上げ、表皮細胞の伸長

距離とスポンジ内の進入細胞数計測を行なった結果、フィルム形状で表皮角化細胞の伸長促進、逆にスポンジ形状で細胞の浸透促進が起こり、皮膚の構成細胞の性質によって要求される ECM の構造が異なるという面白い特性を見出した。細胞の生育環境を形成することこそ ECM の役割であり、人工 ECM において、これを工学的に再現出来るかはバイオマテリアルを駆使した再生医療の課題である。本実験では人工 ECM の作製行程と移植実験とのフィードバックの繰り返しにより、フィルムとスポンジの両方の長所をもつ人工 ECM が完成し、移植実験をもって J.C. の添加により、表皮の再上皮化と肉芽組織への細胞遊走が同時に促進出来る、新しい人工真皮を開発できた。人工真皮は最も成功した人工臓器であり、皮膚再生医療の要である。その課題こそ人工物上に直接再上皮化が起こらない事であり、表皮細胞を生着させるため真皮の再生を待ち、改めて 2 度目の表皮移植を必要としていた。J.C.は再上皮化を先に起こせる事から、その医療応用は皮膚の再生医療に画期的な変革をもたらす事が期待出来ると考えられる。

これらの結果によって人工 ECM を挿入しマトリックスの構成や細胞の活動に影響を与え、有用な作用分子を探す試みは成功したと言える。この方法は新たな生体分子の探索に大変有効であることが示された。

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 5 件)

- 1) Fukui, T., Kawaguchi, A.T., Takekoshi, S., Miyasaka, M., Sumiyoshi, H., Tanaka, R., : Liposome-encapsulated hemoglobin accelerates skin wound healing in diabetic dB/dB mice., *Artif. Organs*, 41, (4), 319-326, 2017, 査読有
- 2) Nakano, Y., Nakao, S., Sumiyoshi, H., Mikami, K., Tannno, Y., Sueoka, M., Kasahara, D., Kimura, H., Moro, T., Kamiya, A., Hozumi, K., Inagaki, Y., :Identification of a novel alpha-fetoprotein-expressing cell population induced by the jagged 1/Notch 2 signal in murin fibrotic liver., *Hepatology communications*, 0, 1-15, 2017, 査読有

- 3) Komachi, T., Sumiyoshi, H., Inagaki, Y., Takeoka, S., Nagase, Y., Okamura, Y.: Adhesive and robust multilayered poly (lactic acid) nanosheets for homostatic dressing in liver injury model., *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 00B, 1-11, 2016, 査読有
- 4) Moro, T., Nakao, S., Sumiyoshi, H., Ishii, T., Miyazawa, M., Ishii, N., Sato, T., Iida, Y., Okada, Y., Tanaka, M., Hayashi, H., Ueha, S., Matsushima, K., Inagaki, Y.: A combination of mitochondrial oxidative stress and excess fat/calorie intake accelerates steatohepatitis by enhancing hepatic CC chemokine production in mice., *pLos ONE*, 11, e0146592, 2016, 査読有
- 5) Imai, J., Hozumi, K., Sumiyoshi, H., Yazawa, M., Hirano, K., Abe, J., Higashi, K., Inagaki, Y., Mine, T.: Anti-fibrotic effects of a novel small compound on the regulation of cytokine production in a mouse model of colorectal fibrosis., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 468, 554-560, 2015, 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

- ① 住吉秀明, 中尾祥絵, 笠原大瑚, 柳川享世, 中野泰博, 稲垣 豊, : ミズクラゲコラーゲンによる皮膚再生促進効果はコラーゲン構造に由来しない, 第 17 回日本再生医療学会総会, 2018 年 3 月 21~23 日, 横浜市, パシフィコ横浜.
- ② 五十嵐敦, 岡村陽介, 高野秀太, 稲垣 豊, 住吉秀明, : 人工皮膚への応用を指向したコラーゲンナノシートの創製と機能評価, 2017 年 6 月 16~17 日, 第 49 回日本結合組織学会学術大会, 津市, 三重県総合文化センター.
- ③ 住吉秀明, 鈴木悠平, 柳川享世, 山口優依, 中野泰博, 五十嵐敦, 岡村陽介, 稲垣 豊, : ミズクラゲコラーゲンによる HaCaT 細胞の遊走と細胞増殖促進効果の検証, 第 49 回日本結合組織学会学術大会, 2017 年 6 月 16~17 日, 津市, 三重県総合文化センター.
- ④ 住吉秀明, 鈴木悠平, 山口優依, 中尾祥絵, 笠原大瑚, 柳川享世, 中野泰博, 稲垣 豊, : ミズクラゲコラーゲンを用いた人工真皮上皮化促進薬の検討, 第 16 回日本

再生医療学会総会, 2017 年 3 月 7~9 日, 仙台市, 宮城県仙台国際センター.

- ⑤ 住吉秀明, 稲垣 豊, : ミズクラゲコラーゲンを用いた、優れた皮膚再生をもたらす人工真皮の開発, 第 48 回日本結合組織学会学術大会, 2016 年 6 月 24~25 日, 長崎市, 長崎大学医学部
- ⑥ 住吉秀明, 柳川享世, 稲垣 豊, : 肝前駆細胞の動員・増殖を促す新規分子を用いた線維間に対する再生治療戦略, 第 102 回日本消化器病学会(招待講演), 2016 年 4 月 21~23 日, 東京, 京王プラザホテル
- ⑦ 住吉秀明, 山岡華児, 東 清史, 柳川享世, 生駒憲広, 馬淵智生, 小澤 晃, 中尾祥絵, 茂呂 忠, 斎藤幸一, 稲垣 豊, : 低分子化合物 HSc025 は Pirin を誘導することにより線維芽細胞の細胞遊走を活性化して創傷治癒を促す, 第 47 回日本結合組織学会学術大会, 2015 年 5 月 14~16 日, 東京都, コクヨホール.

〔図書〕(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住吉 秀明 (SUMIYOSHI, Hideaki)
東海大学・医学部・講師
研究者番号: 60343357

(2) 研究分担者

岡村 陽介 (OKAMURA, Yosuke)
東海大学・工学部・准教授
研究者番号: 40365408

(3) 連携研究者

稲垣 豊 (INAGAKI, Yutaka)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 80193548