

令和元年6月26日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10481

研究課題名(和文)羊膜の特性を模倣し安全で機能的な再生医療材料：臨床応用想定した動物モデルでの検討

研究課題名(英文) Development of safer and more useful materials for regenerative medicine mimicking the properties of amniotic membrane: Studies in animal models designed for clinical use

研究代表者

辻本 洋行 (TSUJIMOTO, Hiroyuki)

同志社大学・研究開発推進機構・研究員

研究者番号：20521272

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)：我々はこれまでの研究にて開発した羊膜の優れた特性を持ち且つ加工性に優れより安全で機能的な再生医療材料を臨床にて応用するための基礎的検討を動物モデルを用いて行った。アルカリ・酸処理コラーゲンを種々の割合で混合し作成したシートに、妊娠後期のラットから採取した羊膜幹細胞の培養上清(CM)や対照のD-MEM液を含浸し、その上でラット角膜角膜細胞の増殖性や組織形成度について調べた。CM含浸シートはD-MEM含有シートに比べ、また各混合シートの中では酸処理コラーゲンの比率が高いものほど増殖性や組織形成度が優れていた。しかしながら酸処理コラーゲンシートは脆弱で操作性が悪く、更なる改良も必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

羊膜には抗炎症・癒着作用、抗感染作用、組織再生誘導作用などの既存の足場材料には無い優れた特性があり、近年特に角膜移植の足場材として等、注目すべき再生医療材料として見直されている。しかしながら本研究のように羊膜が有する優れた特性を持ち、かつ加工性に優れ且つヒト組織に由来する問題の無いより安全な、羊膜に代わりうるより理想的な再生医療材料の報告は無い。今後更なる改良や動物モデルでの検討を重ねることで、角膜等の移植の足場材、またそれ以外にも損傷組織被覆材や癒着防止材等においても優れた再生医療材料として臨床応用してゆくことが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we developed the safer and more functional materials, mimicking the properties of amniotic membrane as an excellent material for regenerative medicine. In this study, we investigated its effects or clinical application by using animal model. On the membrane made of alkali- or acid-treated collagen or their complexes containing the culture medium of stem cells established from amniotic membrane (conditioned medium: CM), the growth of rat corneal epithelial cells were enhanced obviously by condensed CM or acid-treated collagen. Additionally, the tissue formation of the corneal epithelial cells was also enhanced remarkably by CM or acid-treated collagen. However, the acid-treated collagen sheet was too fragile to handle it. Therefore, further improvement is needed to apply it for clinical use.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医学 羊膜 幹細胞 コラーゲン ゼラチン 足場材料 角膜再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分娩の際の付属物である羊膜は、古くは腹部手術の際の癒着防止材や、熱傷に対する被覆材などに用いられていた。しかし近年、羊膜には幹細胞が豊富に含まれることや、抗炎症・癒着作用、抗感染作用、組織再生誘導作用などの既存の足場材料には無い優れた特性があることが明らかとなり、注目すべき再生医療材料として見直されている。特に眼科領域においては、病的角膜病変の切除後の角膜の再生を、癒着形成することなく実現することが可能な優れた再生足場材料として既に臨床応用され良好な成績が報告されている。

しかしながら一方で羊膜は、ヒト由来の生体組織であるため、感染症や拒絶反応等の問題を伴い、また人工的な加工や3次元的使用もできない。そのため前述のような1)羊膜が有する優れた特性を持ち、また2)加工性に優れ且つヒト組織に由来する問題の無いより安全な、羊膜に代わる新しい材料が望まれている。しかしこれまでその様な条件を満たす理想的な再生医療材料は存在しない。

2. 研究の目的

そこで我々はH25-27年度科学研究費助成研究において、前述のような羊膜の優れた特性を持ち、且つ加工性に優れより安全で、機能的な再生医療材料(羊膜幹細胞の培養上清(Conditioned Medium:以下CM)をアルカリ処理や酸処理コラーゲンやゼラチンに含浸させて作成した)を開発し、その基礎的検討を行い報告を行った。本研究はこれを更に発展させ、開発した羊膜模倣再生医療材を、角膜再生モデル等の実際の臨床にて応用する場合を想定した動物実験モデルにてその効果を検討するのを目的とした。

3. 研究の方法

1) 培養上清CMの採取条件の検討

使用するCMの採取時期やその効果の評価を行う為、①妊娠16日令および②妊娠19日令のWisterS/T ratよりそれぞれ羊膜組織を採取し、Trypsin処理法にて羊膜上皮幹細胞除去後、残った組織片培養からさらにcollagenase処理法にて羊膜間葉系幹細胞を単離し20%FBS含有DMEM培地にて培養を3-4代継代を行った後、上記①②由来の羊膜幹細胞についてi)各種幹細胞markerの発現、またその培養上清CMについてii)培養線維芽細胞への影響について検討を行った。

i) 各由来の羊膜幹細胞についての各種幹細胞markerの発現の検討

単離・培養した羊膜幹細胞について幹細胞markerとしてCD29, 44, 109およびOct3/4, Sox2、非幹細胞markerとしてCD11b, 31, 45, 90の各抗体を用いてのフローサイトメトリー解析を行い、それぞれの幹細胞markerや分化markerの発現について検討を行った。

ii) 各由来の羊膜幹細胞の培養上清CMの培養線維芽細胞に対する影響の検討

上記i)の①②如く異なる妊娠時期に採取した羊膜幹細胞の培養培地を無血清DMEM培地に交換した後48時間培養を行い、その培養上清CMを採取した(以下x1CM)。更に採取したCMを濃縮カラム(ピバスピ[®]、サルトリウス)を用いてx5濃縮したのもも作成した(以下x5CM)。

ラット線維芽細胞を 5×10^4 cellを24ウェル培養用プレートの各ウェルに入れ、2%FBS含有DMEM培地0.4mlを加えた。さらに各ウェルに(1) Day16 5xCM (2) Day16 1xCM (3) Day19 5xCM (4) Day19 1xCM (5) 5xDMEM培地 (6) 1xDMEM培地を、それぞれ1/6量ずつ加えたものと(7) 無添加(control)を培養を行い、1, 3, 5, 7日後細胞数を測定し経時的にその増殖を検討した。(n=4)

2) CM含有各種コラーゲンフィルム上でのラット角膜上皮細胞の増殖性・組織形成度の検討

アルカリ処理コラーゲンおよび酸処理コラーゲン水溶液をそれぞれ100/0、80/20、60/40、40/60、20/80、0/100%に混合し、シャーレ上で風乾し厚さおよそ約0.08-0.09mlのフィルムを作成し、さらに約14時間真空下に乾熱滅菌を行い熱架橋した。

各100/0、80/20、60/40、40/60、20/80、0/100%コラーゲンフィルムに、1)の実験にて得られた濃縮5xCMを約0.15ml/cm²ずつ含浸させ約1時間静置した。さらにdeep freezerにて一晚-80度で凍結後、さらに一晚凍結乾燥を行いfreeze dryし、CM含有羊膜模倣コラーゲンフィルムを作成した。また同様の方法にて濃縮5xD-MEM約0.15ml/cm²ずつを含浸した対照用コラーゲンフィルムも作成した。

以上の様にして作成した各フィルム上についてラット角膜上皮細胞の培養を行い、そのi)細胞増殖性、およびii)組織形成性について以下の様に検討を行った。

i) CM含有各種コラーゲンフィルム上でのラット角膜上皮細胞の増殖性の検討

前述の5x濃縮CMもしくは5x濃縮D-MEM含有freeze dryコラーゲンフィルムを24ウェル培養用プレートのウェルに設置後、それぞれのウェルに2%FBS含有DMEM培地0.4mlとラット角膜上皮細胞を 5×10^4 cellを加えて培養を行い、1, 3, 5, 7日後経時的に、細胞数を測定し(n=4)その増殖性を検討した。

ii) CM含有各種コラーゲンフィルム上でのラット角膜上皮細胞の組織形成度の検討

i)と同様の方法にてラット角膜上皮細胞を7日間培養を行った各フィルムおよび4日目に1/6量5xCMもしくは5xD-MEMを各培地に追加した各フィルムを10%ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋し、フィルムの切断面の観察を顕微鏡的に行いそのii)組織形成度について検討を行った。

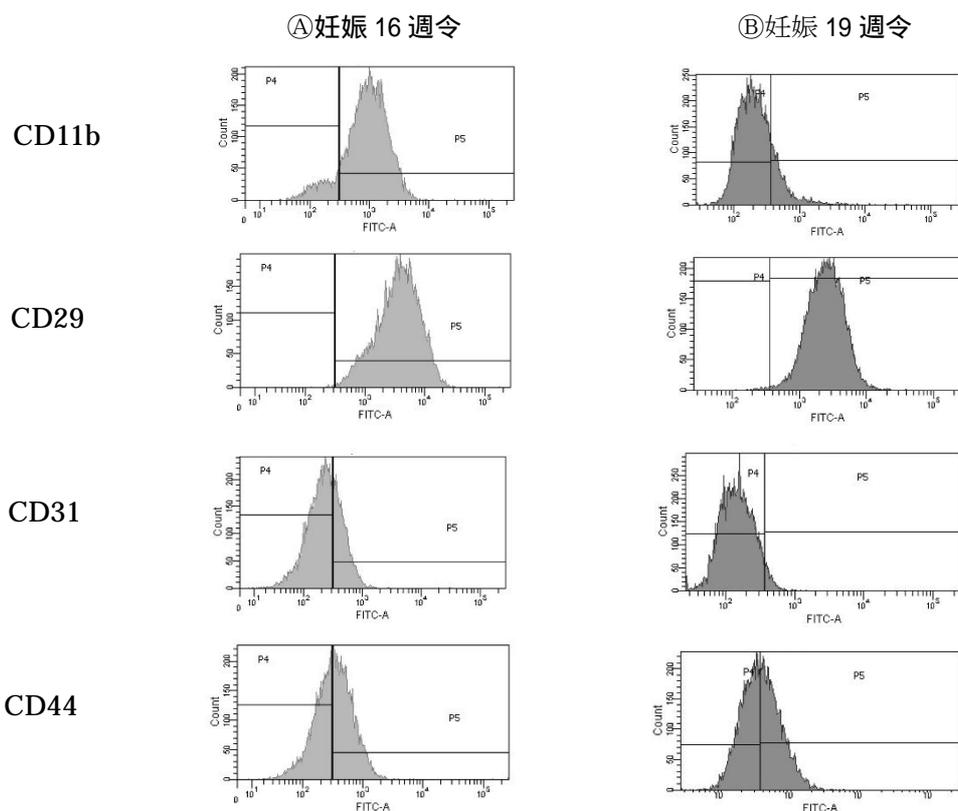
4. 研究成果

1) 培養上清 CM の採取条件の検討

i) 各由来の羊膜幹細胞についての各種幹細胞 marker の発現の検討

Ⓐ妊娠 16 日令およびⒷ妊娠 19 日令のラットより単離培養された羊膜幹細胞を 3-4 代継代し、trypsin/EDTA にて細胞単離した後、下記の抗体を用いてフローサイトメトリーの解析を行ったところ、Ⓑ妊娠 19 日令のラットより単離培養された羊膜幹細胞は、CD29(+)、CD44(+)、CD105(+)、SOX(+)、Oct3/4(+)であり各幹細胞マーカーは陽性であったのに対し、CD11b(-)、CD31(-)、CD45(-)、CD90(-)で血球系や血管系のマーカーは陰性であった。一方、Ⓐ妊娠 16 日令のラットより単離培養された羊膜幹細胞は、CD29(+)、CD44(+)、CD105(+)、SOX(+)および Oct3/4(+)であり各幹細胞マーカーは陽性であったが、CD11b(+)、CD31(+)、CD45(+)、CD90(+)であり血球系や血管系のマーカーも陽性であった。

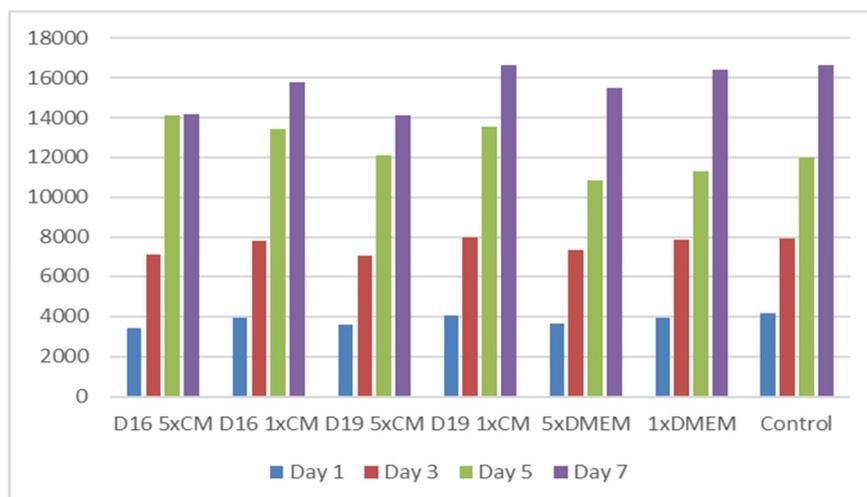
原因としてⒶ妊娠 16 週令はまだ個体として発生・成熟が十分ではなく、羊膜の分離も難しいことから近接する絨毛膜等の組織やその血管組織等が contamination していた可能性が考えられた。



ii) 羊膜幹細胞の培養上清 CM の培養線維芽細胞に対する影響の検討

上記 i) の様にⒶ妊娠 16 日令およびⒷ妊娠 19 日令のラットより採取した羊膜幹細胞の培養上清 CM をそれぞれ採取し(x1CM)、更に濃縮カラムを用いて x5 濃縮したもの (x5CM) を作成した。

24 ウェル培養用プレートにラット線維芽細胞を入れ、2%FBS 含有 DMEM 培地および 1/6 量の (1) D16 5xCM (2) D16 1xCM (3) D19 5xCM (4) D19 1xCM (5) 5xDMEM (6) 1xDMEM および (7) 無添加(control) を培養を行い、細胞数を経時的に測定した。



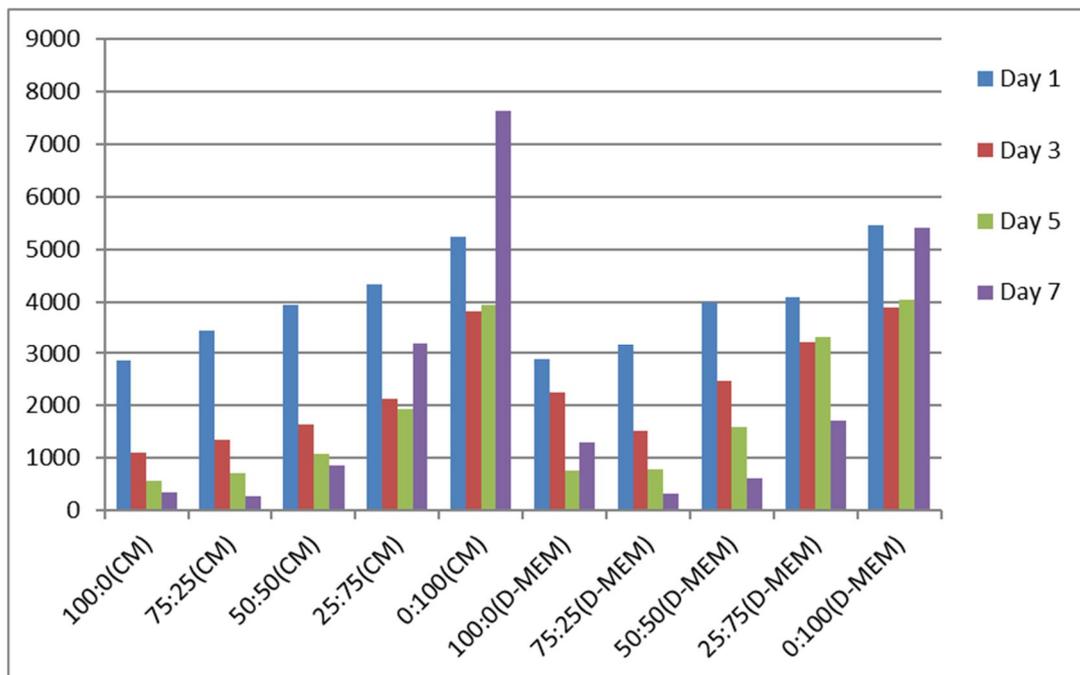
結果、上記のグラフが示す様に 線維芽細胞は各 CM 添加の条件において経時的に増殖を示したが、とくに(1)D16 x5CM および(3)D19 x5CM において線維芽細胞の増殖は、他群に比べ抑えられているよう認められた。

以上 i) ii) の結果より、**Ⓐ**妊娠 16 週令ラット由来の羊膜幹細胞に比べ**Ⓑ**妊娠 19 日令ラット由来羊膜幹細胞はより幹細胞としての純度が高く、また採取できる細胞の収量も**Ⓑ**妊娠 19 週令より多く確実なことより、以降の実験においては**Ⓑ**妊娠 19 週令ラット由来の羊膜幹細胞を、またその CM の濃縮度については x5CM を用いることとした。

2) CM 含有各種コラーゲンフィルム上でのラット角膜上皮細胞の増殖性・組織形成度の検討

i) CM 含有各種コラーゲンフィルム上でのラット角膜上皮細胞の増殖性の検討

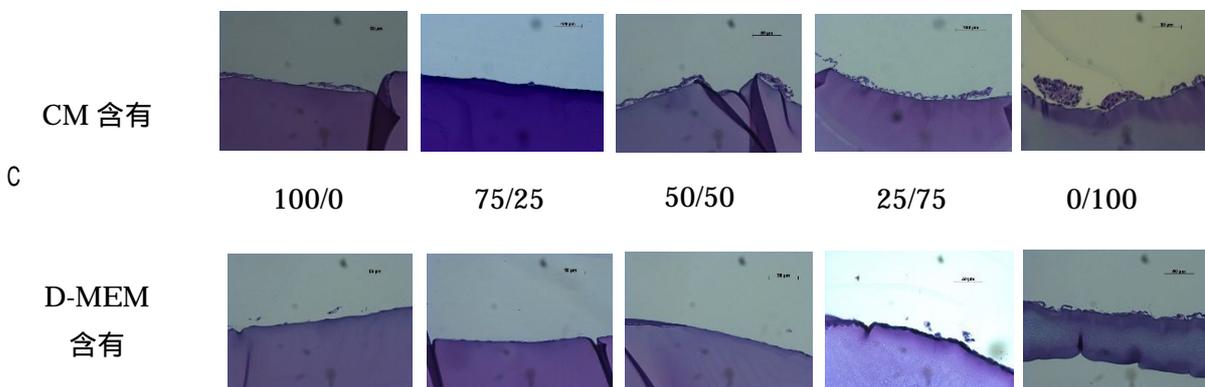
前述の酸性コラーゲン/アルカリコラーゲンの含有比が、100/0、80/20、60/40、40/60、20/80、0/100 の混合コラーゲンフィルムに、5xCM もしくは 5xD-MEM を含浸 freeze dry した CM 含有羊膜模倣コラーゲンフィルム上にて、ラット角膜上皮細胞を 5×10^4 cell を加えて培養を行い、1, 3, 5, 7 日後経時的に、細胞数を測定した。



結果、上図の如く CM 含浸コラーゲンシートは D-MEM シートに比べて総じて増殖性が良好であった。また各混合コラーゲンの中では、酸処理コラーゲンの比率が高いものほど増殖性に優れていることが分かった。

ii) CM 含有各種コラーゲンフィルム上でのラット角膜上皮細胞の組織形成度の検討

i) と同様の方法にてラット角膜上皮細胞を 7 日間培養を行ったフィルムを固定後、パラフィン包埋後、各フィルムの切断面の観察を顕微鏡的に行い、その細胞の増殖性や組織形成度について検討を行った。



結果、上図の如く各混合コラーゲンの中では、酸処理コラーゲンの比率が高いものほど細胞数が多く重層化も認められ増殖性や組織形成度に優れていた。また CM 含浸コラーゲンシートも D-MEM シートに比べて総じて増殖性や組織形成度に優れていた。しかしながら酸処理コラーゲンシートは脆弱・軟弱でその操作性も悪いことから更なる改善が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線実線、研究分担者及び連携研究者には下線点線)
〔雑誌論文〕(計 8 件)

Miyamoto H, Tsujimoto H, Horii T, Ozamoto Y, Ueda J, Takagi T, Saitoh N, Hagiwara A. The influences of a novel anti-adhesion device, thermally cross-linked gelatin film on peritoneal dissemination of tumor cells: The in vitro and in vivo experiments using murine carcinomatous peritonitis models. J Biomed Mater Res B (査読有) 106(6), 2018, pp2122-2130 DOI:10.1002/jbm.b.34017

Morita S, Takagi T, Abe R, Tsujimoto H, Ozamoto Y, Torii H, Hagiwara A. Newly Developed Polyglycolic Acid Reinforcement Unified with Sodium Alginate to Prevent Adhesion. Biomed Res Int (査読有) 4515949, 2018, pp1-8 DOI:10.1155/2018/4515949

Takagi T, Tsujimoto H, Torii H, Ozamoto Y, Hagiwara A. Two-layer sheet of gelatin: A new topical hemostatic agent. Asian J Surg (査読有) 41(2), 2018, pp124-130 DOI: 10.1016/j.asjsur.2016.09.007

Horii T, Tsujimoto H, Miyamoto H, Yamanaka K, Tanaka S, Torii H, Ozamoto Y, Takamori H, Nakamachi E, Ikada Y, Hagiwara A. Physical and biological properties of a novel anti-adhesion material made of thermally cross-linked gelatin film: Investigation of the usefulness as anti-adhesion material. J Biomed Mater Res B (査読有) 106(2), 2018, pp689-696 DOI: 10.1002/jbm.b.33880

Matoba M, Takagi T, Tsujimoto H, Ozamoto Y, Ueda J, Hagiwara A. Reduction of pulmonary air leaks with a combination of polyglycolic acid sheet and alginate gel in rats. Biomed Res Int (査読有) 3808675, 2018, pp1-6 DOI: 10.1155/2018/3808675

Takagi T, Tsujimoto H, Torii H, Ozamoto Y, Hagiwara A. New polyglycolic acid fabric for the prevention of postoperative pancreatic fistulas. Asian J Surg (査読有) 41, 2018, pp59-64 DOI: 10.1016/j.asjsur.2016.08.001

Torii H, Takagi T, Urabe M, Tsujimoto H, Ozamoto Y, Miyamoto H, Ikada Y, Hagiwara A. Anti-adhesive effects of a newly developed two-layered gelatin sheet in dogs. J Obstet Gynaecol Res (査読有) 43(8), 2017, pp1317-1325 DOI: 10.1111/jog.13358

Tsujimoto H, Yamanaka K, Miyamoto H, Horii T, Abe R, Tanaka S, Torii H, Ozamoto Y, Takagi T, Takimoto K, Torii T, Konishi H, Takamori H, Hagiwara A. A basic study of the effect of the shielding method with polyglycolic acid fabric and fibrin glue after endoscopic submucosal dissection. Endosc Int Open (査読有) 04(12), 2016, ppE1298-E1304 DOI: 10.1055/s-0042-118208

〔学会発表〕(計 6 件)

Tsujimoto H, Horii T, Demizu T, Torii H, Ozamoto Y, Takagi T, Takamori H, Morita S, Ikada Y, Hagiwara A. Novel anti-adhesion devices using scaffold material for regenerative medicine: Development of thermally cross-linked gelatin film and its application. 5th TERMIS World Congress 2018.9.4-7 (京都市、京都国際会議場)

辻本洋行, 宮本博恵, 堀井常人, 鳥井裕子, 小座本雄軌, 高森秀樹, 鈴木周子, 森田真一郎, 高木敏貴, 筏義人, 萩原明於. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 -熱架橋 gelatin film の癌の腹膜播種性転移に与える影響について-. 第 25 回日本消化器関連学会週間(JDDW) 2017.10.12-14 (博多市、福岡国際会議場)

辻本洋行, 宮本博恵, 山中皓暉, 堀井常人, 韓沛, 田中翔大, 鳥井裕子, 小座本雄軌, 高森秀樹, 鈴木周子, 森田真一郎, 高木敏貴, 筏義人, 萩原明於. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 熱架橋 gelatin film の物理的・生物学的特性 -癒着防止の mechanism について. 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017.4.27-29 (横浜市、パシフィコ横浜)

Tsujimoto H, Horii T, Miyamoto H, Torii H, Ozamoto Y, Takagi T, Takamori H, Suzuki S, Morita S, Ikada Y, Hagiwara A. Novel anti-adhesion devices using scaffold material for regenerative medicine: Development of thermally cross-linked gelatin film and its application. 40th International College of Surgeons 2016.10.23-26 (京都市、京都国際会議場)

辻本洋行, 宮本博恵, 山中皓暉, 堀井常人, 韓沛, 田中翔大, 鳥井裕子, 小座本雄軌, 高森秀樹, 鈴木周子, 森田真一郎, 筏義人, 萩原明於. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 -熱架橋 gelatin film の癌の腹膜播種性転移に与える影響について-. 第 24 回日本消化器関連学会週間(JDDW) 2016.11.3-6 (神戸市、神戸国際会議場)

辻本洋行, 堀井常人, 宮本博恵, 山中皓暉, 小座本雄軌, 鳥井裕子, 高森秀樹, 鈴木周子, 森田真一郎, 筏義人, 萩原明於. 再生の足場材料を用いた癒着防止材熱架橋 gelatin film の物理的・生物学的特性 -癒着防止の mechanism について-. 第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016.4.14-16 (大阪市、大阪国際会議場)

〔図書〕(計 2 件)

辻本洋行, 高木敏貴, 萩原明於, シーエムシー出版, 医療用バイオマテリアルの研究開発 第 5 章 PGA 不織布の線維径などの構造の検討, 2017, pp224-236

辻本洋行, 萩原明於, 技術情報協会, 手術用シーラント材・癒着防止材の利便性化向上を

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：萩原 明於

ローマ字氏名：(HAGIWARA, Akeo)

所属研究機関名：同志社大学

部局名：生命医科学部 医生命システム学科

職名：教授

研究者番号（8桁）：90198648

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：堀井 常人

ローマ字氏名：(HORII, Tsunehito)

研究協力者氏名：宮本 博恵

ローマ字氏名：(MIYAMOTO, Hiroe)

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、研究者個人に帰属されます。