

令和 4 年 9 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K12085

研究課題名(和文)人工ラミニンを用いた腺組織再生プラットフォームの開発

研究課題名(英文)Development of artificial laminin gel platform for acinar structure regeneration

研究代表者

保住 建太郎 (Hozumi, Kentaro)

北里大学・北里大学保健衛生専門学院・講師

研究者番号：10453804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：発生過程における器官形成は、上皮細胞が結合組織内に貫入しながら大きくなり成熟がすすむ。本研究では、器官を包み込むように存在する細胞外マトリックス(基底膜)の主要成分であるラミニンを模倣した人工ラミニンを開発し、腺組織再生に利用可能な細胞培養プラットフォームの開発を行った。生体由来のラミニンと同等に近い形態を誘導する人工ラミニンの開発に成功したが、再生された組織の機能は生体由来ラミニンには及ばなかった。その詳細を検証したところ、組織に接しているラミニンのターンオーバーが重要であることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療に利用可能な人工細胞外マトリックスとしてペプチド-高分子多糖ハイドロゲルを作製し分化誘導型培養プラットフォームの開発をおこなった。誘導された腺器官の機能は生体由来の細胞外マトリックスを用いた場合より劣っていた。この理由として外因性の細胞外マトリックスと内因性の細胞外マトリックスのターンオーバーが重要であることが示唆された。内因性の細胞外マトリックスをつなぎ止め、かつ細胞によって認識・分解されるデザインを培養プラットフォームに組み込むことが、培養プラットフォームの設計にあたっての一つのキーとなる。

研究成果の概要(英文)：The major component of Matrigel is laminin, a multi-functional extracellular matrix protein. Laminin is one of the important extracellular matrix proteins which promotes salivary gland cell differentiation. In this study, we constructed artificial laminin using the biologically active peptide and polysaccharide hydrogel as a cell culture platform. We could partially mimic the function of laminin. When we culture the salivary gland cells on Matrigel and artificial laminin, the shape of small glands (acinar form) was similar. But the function of the gland were not equal. We identified that turnover of exogenous laminin and secreted laminin is important to promote the functional gland.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ラミニン 基底膜 キトサン ハイドロゲル 活性ペプチド 細胞外マトリックス

### 1. 研究開始当初の背景

発生過程における器官の原基は、基底膜と呼ばれる特殊な薄いシート状の細胞外マトリックスに包まれている。上皮由来の原基は基底膜を認識・分解・分泌することで間葉組織サイドにむかって浸潤する様に成長し、成熟した器官を形成する。これまで、我々は基底膜の主要成分であるラミニンを模倣した人工ラミニンの開発を行ってきた。腺組織の発生課程には、1-基底膜との結合による細胞シグナル、2-基底膜が形成する物理的環境、3-発生過程にともなう基底膜のリモデリング、4-分岐を誘導する基底膜の変化、5-各種成長因子による調整、6-神経細胞による極性の誘導、7-細胞-細胞間の結合による情報伝達、などのプロセスが必須であることが報告されてきた。しかしながら、これらを統合的に検証した報告はない。これらを同時に検証可能で腺組織分化誘導活性をしめす腺細胞培養プラットフォームを開発することで、再生医療への応用と発展につながると考えた。

### 2. 研究の目的

*in vitro* で培養細胞に分化を誘導するには、マトリゲルやコラーゲンなどのECM上で細胞を培養する必要がある。細胞は一般的にプラスチックディッシュ上での培養では増殖傾向をしめし、分化誘導は難しい。このことは、生体内で分化方向にあるほとんどの細胞が、硬いプラスチックのような物質と接触しているだけでなく柔らかく受容体特異的なシグナルを誘導する細胞外マトリックス分子と接触していることから明らかである。基底膜の主要な生物活性を担っているラミニンは、一分子で10種類程度の異なる細胞膜受容体と結合し、19種類ものアイソフォームを有する。我々はラミニン配列由来の生物活性ペプチドが特異的に細胞膜受容体と結合すること、細胞接着・遊走・分化促進活性をしめす複数の異なるペプチドをキトサンなどの多糖マトリックスに混合して固定化することで、生物活性の制御が可能な人工ラミニンともよべる材料を開発してきた。本研究では、合成ペプチドとキトサンハイドロゲルとを組み合わせることによって腺組織再生に特化した細胞培養プラットフォームとしての人工ラミニンを開発し、腺組織の発生メカニズムの解明と再生医療へと応用可能な知見の集積を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 異なる受容体刺激によって活性上昇を誘導するペプチドの抽出と組み合わせの最適化

マトリゲルの主成分であるラミニン-111由来の活性ペプチドは29種類あり、生物活性の違いによって6グループに分類できる。6グループから抽出したペプチドを様々な混合比で固定化した混合ペプチド-キトサンハイドロゲルを用いて、異なる受容体間クロストークによって生物活性を促進させる方法の開発をおこなった。

#### (2) キトサンハイドロゲルの作製方法と固さ調節の最適化

本研究では、純水には不溶であるが有機酸水溶液には可溶であるキトサンの特性を応用し、キトサンを可溶化すると同時に架橋化も可能であるジカルボン酸を用いた架橋方法の探索を試みた。さらに、合成ペプチドの固定化とキトサンの架橋を同時に行うことで、簡便に可溶化、ゲル化、ペプチドの固定化が可能なペプチド-キトサンハイドロゲル作製法を開発をおこなった。

#### (3) 誘導された腺細胞の機能解析

腺細胞の分化に伴うECM発現プロファイルに注目し、遺伝子レベルだけでなく人工ラミニンの特長を生かしたタンパク質レベルでの評価をこころみた。

### 4. 研究成果

#### (1) 異なる受容体刺激によって活性上昇を誘導するペプチドの抽出と組み合わせの最適化

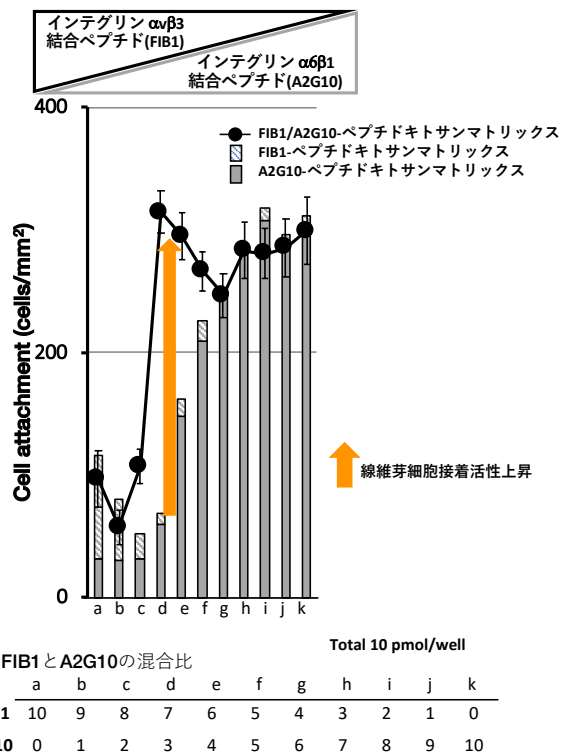
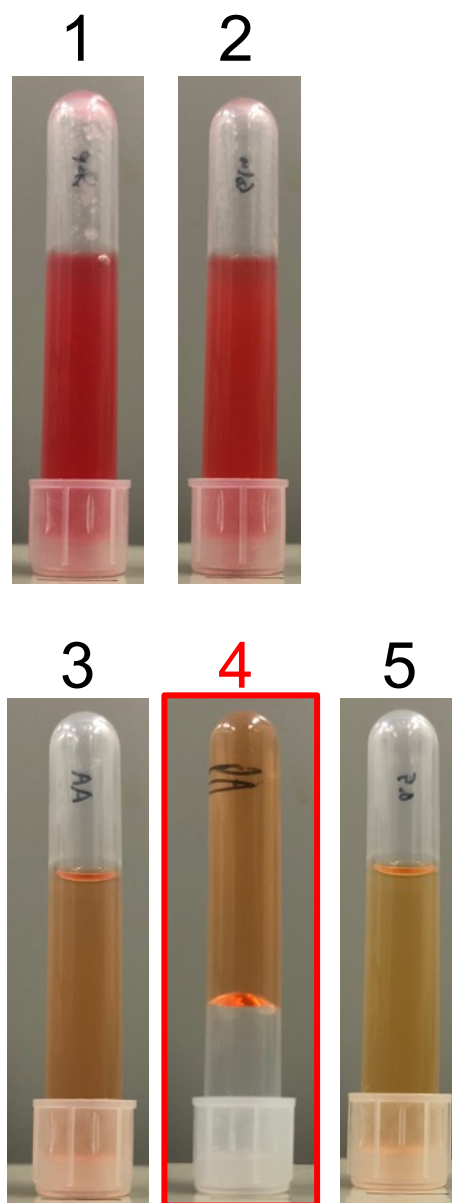


図 混合FIB1/A2G10-キトサンマトリックスとFIB1-およびA2G10-キトサンマトリックスとの線維芽細胞接着活性の比較

生体内の細胞は、インテグリンをはじめとした様々な細胞膜受容体を介して ECM を認識している。ECM と結合する主要な受容体であるインテグリンは 24 種類のサブタイプが知られているが、サブタイプ間のクロストークに関しては未だ限定的な検証に限られている。以前、我々はインテグリン $\alpha 3 \beta 1$  結合ペプチドとインテグリン $\alpha 2 \beta 1$  結合ペプチドを混合して高分子多糖マトリックスに固定化した 2 種混合ペプチド-高分子多糖マトリックスが、インテグリン間の相乗的なクロストークによって特定の細胞内シグナル分子のリン酸化を誘起し細胞接着活性を抑制することを報告し、2 種混合ペプチド-高分子多糖マトリックスが、インテグリン間クロストークの解析に利用可能であることを示した。本研究では、四種のインテグリン結合ペプチドを様々な組合せで混合した二種混合ペプチド-高分子多糖マトリックスを調製し、細胞接着活性を促進するインテグリン間クロストークを探索すると同時に、そのメカニズムを検証した。一種類のインテグリン結合ペプチドそれぞれを固定化した四種類のペプチド-キトサンマトリックスは、全てが細胞接着活性を示し、接着した細胞はインテグリンを介した細胞接着に特異的な伸展形態を示した。次に、インテグリン-インテグリン間クロストークを検討するために二種混合ペプチド-キトサンマトリックス（五種類の組合せ）を様々な混合比で調製し、細胞接着活性におよぼす影響を検証した。その結果、インテグリン $\alpha v \beta 3$  と結合する FIB1 ペプチドとインテグリン $\alpha 6 \beta 1$  と結合する A2G10 ペプチドを 6:4 のモル比で混合した FIB1/A2G10=6/4-キトサンマトリックスは、FIB1-および A2G10-キトサンマトリックスの細胞接着活性を足した場合と比較して約三倍の細胞接着活性と細胞伸展活性の促進を示した。非活性型 FIB1 ペプチドである FIB1E を用いた FIB1E/A2G10-キトサンマトリックスの細胞接着活性場合は A2G10-キトサンマトリックスと同等であった。さらに FIB1/A2G10=6/4-キトサンマトリックスの細胞では FAK と Talin のリン酸化が促進されていることが確認できた。以上の結果から、インテグリン $\alpha v \beta 3$  とインテグリン $\alpha 6 \beta 1$  は特異的なモル比で、細胞接着活性および伸展活性を細胞内シグナルのリン酸化を伴って促進することがわかった。細胞膜受容体特異的な結合活性をもつ細胞接着ペプチドを混合して用いることで、特定の受容体間クロストーク誘起できることがわかった。

## (2) キトサンハイドロゲルの作製方法と固さ調節の最適化

本研究では、我々がこれまで開発してきた細胞培養基材である細胞外マトリックス由来活性ペプチド-キトサンマトリックスを改良しキトサンをハイドロゲル化することで、唾液腺細胞に効率よく分化を誘導する人工細胞外マトリックスの開発を目的とした。分子内に多くの一級アミンを有する塩基性多糖であるキトサンは、水や PBS には溶解せず、酢酸などの有機酸水溶液に溶解する。そこで分子内にカルボキシル基を 2 つ持つジカルボン酸の水溶液にキトサンを溶解させた。次に、キトサンの一級アミンとジカルボン酸との間にアミド結合を誘導することで、キトサン分子をジカルボン酸で架橋したキトサンハイドロゲルを作成した。さらに、細胞外マトリックス由来活性ペプチドを固定化し、その生物活性を培養細胞を用いて評価した。様々な構造を持つジカルボン酸を用いてキトサンの溶解性を確認したところ、直鎖状飽和ジカルボン酸水溶液にはキトサンが溶解することがわかった。次に、カルボジイミドを用いた系でキトサンの一級アミンと直鎖状飽和ジカルボン酸のカルボキシル基にアミド結合の形成を誘導したところ、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸を用いた際にキトサンハイドロゲルを得ることができた。形成したキトサンハイドロゲルを FT-IR で測定したところアミド由来のピークが観察されたこと、BCA 比色法にてアミド結合の増加が確認されたことから、キトサンが直鎖状飽和ジカルボン酸とのアミド結合によって架橋されたことで、ハイドロゲルの形成が誘導されたことが示された。次にアミノ酸系のジカルボン酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸を用いたところ、キトサンの溶解と架橋かによる粘度の



1 アスパラギン酸のみ, 2 グルタミン酸のみ, 3 アスパラギン酸とアジピン酸, 4 グルタミン酸とアジピン酸, 5 架橋なし では4のみがゲル化した

上昇傾向は観察されたが、ハイドロゲルは形成されなかった。しかしながら、アジピン酸とグルタミン酸を混合し、その混合比を調整することで固さの制御が可能なハイドロゲルを作製できることがわかった。次に、細胞外マトリックス由来細胞接着活性ペプチドを固定化したペプチド-キトサンハイドロゲルの生物活性を、ヒト皮膚線維芽細胞およびヒト唾液腺細胞を用いて評価したところ、いずれも細胞接着活性が観察された。さらに、ヒト唾液腺細胞が分化することで唾液腺様構造を形成するかどうかを評価したところ、唾液腺様構造が観察された。以上の結果から、キトサンをジカルボン酸で架橋化したキトサンハイドロゲルに細胞接着活性ペプチドを固定化することで、細胞に分化を誘導可能なキトサンハイドロゲルの開発が可能となった。現在は、論文投稿に向けて準備を行なっている。

### (3) 誘導された腺細胞の機能解析

本研究で開発した細胞培養プラットフォームとしての人工ラミニンと生体由来でラミニンを大量に含むマトリゲルは、ともに腺細胞を分化誘導し、腺様構造の形成をうながした。そこで、腺組織のタンパク質分泌と RNA 発現、および唾液腺機能発現の指標として各種マーカーに関して解析をおこなった。その結果、細胞外マトリックスタンパク質の RNA 発現に関しては同程度であったが、たんぱく質発現と分化マーカー発現は人工ラミニンがラミニンに対して劣っていた。この結果は、外因性のラミニンによって内因性ラミニンの分泌が誘導されていることを意味しているかもしれない。現在は、本現象の詳細について解析中である。

また、以上の結果を社会に開示する目的として、人工ラミニンの構築を目指した細胞培養プラットフォームの開発に関してまとめた総説を 1 報発表した (発表図書①)。本研究期間中に発生した新型コロナウイルス感染症の影響で生じた研究の遅延は否めないが、今後の研究に向けた重要な知見を得ることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ikeuchi Tomoko, Kanan Yogita, Long Da, de Vega Susana, Hozumi Kentaro, Nomizu Motoyoshi, Campochario Peter A., Yamada Yoshihiko	4. 巻 129
2. 論文標題 Fibulin-7 C-terminal fragment and its active synthetic peptide suppress choroidal and retinal neovascularization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microvascular Research	6. 最初と最後の頁 103986 ~ 103986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mvr.2020.103986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sugawara Yumika, Hamada Keisuke, Yamada Yuji, Kumai Jun, Kanagawa Motoi, Kobayashi Kazuhiro, Toda Tatsushi, Negishi Yoichi, Katagiri Fumihiko, Hozumi Kentaro, Nomizu Motoyoshi, Kikkawa Yamato	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of dystroglycan binding in adhesion of human induced pluripotent stem cells to laminin-511 E8 fragment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49669-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kumai Jun, Yamada Yuji, Hamada Keisuke, Katagiri Fumihiko, Hozumi Kentaro, Kikkawa Yamato, Nomizu Motoyoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Identification of active sequences in human laminin 5 G domain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 e3218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/psc.3218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hozumi Kentaro, Nomizu Motoyoshi	4. 巻 80
2. 論文標題 Cell Adhesion Activity of Peptides Conjugated to Polysaccharides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Protocols in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e53 ~ e53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpcb.53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hozumi Kentaro, Nomizu Motoyoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Mixed Peptide-Conjugated Chitosan Matrices as Multi-Receptor Targeted Cell-Adhesive Scaffolds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2713 ~ 2713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19092713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hozumi Kentaro, Teranishi Yui, Enomoto Sayaka, Katagiri Fumihiko, Kikkawa Yamato, Nomizu Motoyoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Identification of specific integrin cross-talk for dermal fibroblast cell adhesion using a mixed peptide-chitosan matrix	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomaterials Applications	6. 最初と最後の頁 893 ~ 902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0885328218823457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikkawa Yamato, Enomoto-Okawa Yurie, Fujiyama Aiko, Fukuhara Takeshi, Harashima Nozomi, Sugawara Yumika, Negishi Yoichi, Katagiri Fumihiko, Hozumi Kentaro, Nomizu Motoyoshi, Ito Yuji	4. 巻 8
2. 論文標題 Internalization of CD239 highly expressed in breast cancer cells: a potential antigen for antibody-drug conjugates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24961-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Kentaro Hozumi, Chie Takahashi, Keisuke Hamada, Yuji Yamada, Yamato Kikkawa, Motoyoshi Nomizu
2. 発表標題 Development of cell culture platforms using dicarboxylic acids crosslinked chitosan hydrogels
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保住建太郎
2. 発表標題 ラミニン由来活性ペプチドを用いた細胞接着性マトリックスの開発
3. 学会等名 日本接着学会東北支部講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保住建太郎、高橋知衣、山田隼人、内山千尋、小林彩乃、平賀瑠衣、林良雄、野水基義
2. 発表標題 細胞接着ペプチドを固定化したキトサン/ジカルボン酸ハイドロゲルの開発
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Hozumi, C. Takahashi, H. Yamada, C. Uchiyama, A. Kobayashi, R. Hiraga, M. Nomizu
2. 発表標題 Cell Adhesive Peptide Conjugated Chitosan Hydrogel as Salivary Gland Cell Culture Scaffolds
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 F. Katagiri, M. Hashidume, N. Midorikawa, S. Hiraoka, K. Kimura, R. Takayanagi, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu, Y. Yamada
2. 発表標題 Identification of Biologically Active Site in Mouse Laminin Alpha3b Chain N Terminal Region
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Kikkawa, Y. Sugawara, K. Hamada, Y. Yamada, J. Kumai, M. Kanagawa, K. Kobayashi, T. Toda, Y. Negishi, F. Katagiri, K. Hozumi, M. Nomizu
2. 発表標題 Characterization of Dystroglycan Binding in Adhesion of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Laminin 511 E8 Fragment
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋知衣、保住建太郎、荒川真大、五十嵐千尋、今坂萌、高橋慧、長谷川知輝、田中理恵子、清瀬千佳子
2. 発表標題 小胞体ストレス誘発性脂肪肝におけるビタミン E 同族体摂取の影響
3. 学会等名 第 31 回ビタミンE研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保住建太郎、寺西優衣、片桐文彦、吉川大和、野水基義
2. 発表標題 二種混合ペプチド-多糖マトリックスを用いた インテグリンサブタイプ間クロストークの評価とメカニズム解明
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Kikkawa, Y. Enomoto-Okawa, A. Fujiyama, T. Fukuhara, N. Harashima, Y. Sugawara, K. Ikari, Y. Negishi, F. Ktagiri, K. Hozumi, M. Nomizu, Y. Ito
2. 発表標題 Internalization of CD239, a laminin a5 receptor, in human breast cancer: a novel antigen for antibody-drug conjugates
3. 学会等名 American Society of Matrix Biology 2018 Biennial Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 K. Hamada, Y. Gu, J. Kumai, K. Nakamura, F. Katagiri, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu
2. 発表標題 Modification of chain-specific cell adhesion sequences in the short arm region of laminin b chain
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium 第55回ペプチド討論会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 G. Zhang, K. Hamada, J. Kumai, F. Katagiri, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu
2. 発表標題 Identification of $\alpha$ -dystroglycan binding sequences in the laminin $\alpha$ 2 chain LG4-5 modules using the peptide-chitosan matrix
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium 第55回ペプチド討論会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Kikkawa, Y. Sugawara, K. Hamada, J. Kumai, M. Kanagawa, K. Kobayashi, T. Toda, F. Katagiri, K. Hozumi, M. Nomizu
2. 発表標題 Attachment of human iPS cells to dystroglycan-binding peptides derived from laminin-511 E8 fragment
3. 学会等名 American Society of Cell Biology/European Molecular Biology Organization 2018 meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Hamada, G. Zhang, J. Kumai, F. Katagiri, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu
2. 発表標題 Identification of $\alpha$ -dystroglycan binding peptide sequences in the laminin $\alpha$ 2 chain LG4-5 modules using the peptide-chitosan matrix
3. 学会等名 American Society of Cell Biology/European Molecular Biology Organization 2018 meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川大和、大川(榎元)友里恵、藤山愛子、福原武志、原島望、菅原由美香、碓和樹、根岸洋一、片桐文彦、保住建太郎、野水基義、伊東祐二
2. 発表標題 乳癌細胞において内在化するラミニン 5鎖受容体 CD239に対する抗体-薬物結合体の作製
3. 学会等名 第50回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 保住建太郎、野水基義	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 BIO Clinica	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>リサーチマップ  <a href="https://researchmap.jp/KentaroHozumi">https://researchmap.jp/KentaroHozumi</a></p>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------