

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09060

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：鱗コラーゲンをを用いた新しい改良

研究課題名(英文) Development of safer and more useful materials for regenerative medicine mimicking the properties of amniotic membrane: new modification by fish-scale collagen

研究代表者

辻本 洋行 (TSUJIMOTO, Hiroyuki)

同志社大学・研究開発推進機構・嘱託研究員

研究者番号：20521272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいくつかのこれまでの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応用するための基礎的検討を行ってきた。本実験においてはより安全で優れた魚類の鱗コラーゲンをにて作成したフィルムや従来の豚コラーゲンフィルムに、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上皮細胞を培養しその増殖性や組織形成等について調べた。CM含鱗コラーゲンフィルムは豚コラーゲンフィルムに比べ、またCM含有フィルムはD-MEM含有フィルムに比べ細胞の増殖性においてより優れていた。今後細胞分化や組織形成についても更なる改良が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

羊膜は抗炎症・癒着防止作用、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、近年角膜移植の足場材等、注目すべき再生医療材料として見直されている。しかしこれまで我々が報告してきたような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再生医療材料の他報告は無い。本研究においてはより安全で優れた魚類の鱗コラーゲンをを用いることで、従来の豚や牛のコラーゲンのより優れた増殖性が示され、今後更なる改良や動物モデルでの検討を重ねることで、移植の足場材や損傷組織被覆材や癒着防止材等、より優れた再生医療材料として臨床応用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 modified the materials by using fish-scale collagen. On the films made from fish-scale or conventional pig collagen containing the culture medium of stem cells established from amniotic membrane (CM), the growth of rat corneal epithelial cells was enhanced obviously by fish-scale collagen. Additionally, the growth was also enhanced remarkably by condensed CM more than control condensed medium (D-MEM). To generate more mature differentiation or tissue formation, further modification is needed.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医学 再生足場材料 羊膜幹細胞 鱗コラーゲン

## 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「羊膜の特性を模倣したより安全で機能的な再生医療材料の作成」(辻本)、28-30 年度科学研究費助成研究「羊膜の特性を模倣し安全で機能的な再生医療材料：臨床応用を相当した動物モデルでの検討」(辻本)において、先に述べた羊膜幹細胞の分泌する液性成分を既存のコラーゲンやゼラチンから作製した薄膜やスポンジ材に含有することで、安全で且つ加工性に優れ機能的な羊膜模倣再生医療材を開発し、また角膜再生といった臨床応用する場合を想定した実験モデルにおいてその効果を確認した。

本研究においては、上述の研究結果を更に発展させるため、新規に開発された魚類の鱗コラーゲンをを用いた改良を行った。その理由は、従来の牛豚由来のコラーゲンは人畜共通感染症の問題や、コラーゲン構造にとって重要な3次元フィブリル構造を作れないため生体内では不安定である等の問題があるのに対して、鱗コラーゲンは1)魚類と人類との共通の感染症が無くより安全であること、2)変性温度が高いことから牛豚由来のコラーゲンでは不可能であった3次元フィブリル構造をとることが出来るため生体内でも安定し、結果、より優れた細胞増殖能や分化能を有するとされることによる。我々は鱗コラーゲンから成る薄膜材に、羊膜幹細胞の分泌する液性成分を含浸し、改良した羊膜模倣再生医療材を作成し、その細胞増殖や分化等の基礎的な特性や効果について検討を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 羊膜幹細胞の評価と培養上清 CM の採取

##### 羊膜幹細胞の評価

使用する羊膜幹細胞の評価と培養上清 CM の採取を行う為、以前の研究にて得られた条件の設定に基づき妊娠 19 日令の WisterS/T rat より羊膜組織を採取し、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た。20%FBS 含有 D-MEM 培地にて培養を 3-4 代継代を行った後、以下に述べる各種幹細胞 marker の発現について検討を行った。幹細胞 marker として CD29, 44, 109 及び 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。

##### 羊膜幹細胞の培養上清 CM の採取と濃縮

上記において検討した羊膜幹細胞の培養後、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(ピバスピン<sup>®</sup>、サルトリウス)を用いて 5 倍濃縮したのものも作成した(以下 x5CM)。

#### (2) CM 含有鱗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

##### CM 含有鱗コラーゲンフィルム及び対象豚コラーゲンフィルムの作成

鱗コラーゲンは本研究の提携先である多木化学株式会社(兵庫県加古川市)より提供された魚類の鱗コラーゲンより脱塩処理法(国際特許 W02012/070679)にて作成された薄膜(厚さ約 30 $\mu$ m)を用いた。一方対象の豚コラーゲンフィルムは市販のコラーゲングル(新田ゼラチン、Cell Matrix Type Ip)を用いて casting 法にて作成した(厚さ約 30 $\mu$ m)。何れのフィルムも乾熱機にて約 8 時間真空下に乾熱滅菌を行い熱架橋を行った。

##### CM 含有及び対象 D-MEM 含有鱗・豚コラーゲンフィルムと各実験群の作成

上記(2)にて得られた鱗及び豚架橋コラーゲンフィルムを直径約 6mm 大の円形に切り抜き、96 well プレートの各 well 底部においた後、それぞれに対して(1)の実験にて得られた濃縮 5xCM を約 0.15ml/cm<sup>2</sup> ずつ含浸させ約 1 時間静置した。また対照用として同様の方法にて作成した 5 倍濃縮 D-MEM (5xD-MEM) を約 0.15ml/cm<sup>2</sup> ずつを各フィルムに含浸させ約 1 時間静置し、結果以下実験群を作成した⑦CM 含有鱗コラーゲン群⑧D-MEM 含有鱗コラーゲン群⑨CM 含有豚コラーゲン群⑩D-MEM 含有豚コラーゲン群。(各 n=3)

##### 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

上述(2)の各実験群に対しそれぞれの well に 2%FBS 含有 DMEM 培地 0.4ml とラット角膜上皮細胞を 2x10<sup>3</sup> cell を加えて培養を行い、1, 4, 7 日後経時的に、MTT 法にて細胞数を測定しその増殖性を検討した。

(3)CM 含有鱗コラーゲンフィルム上でのラット角膜上皮細胞の組織学的検討

CM 含有及び対象 D-MEM 含有鱗・豚コラーゲンフィルムと各実験群の作成

上記(2)にて得られた鱗及び豚架橋コラーゲンフィルム(直径約1.5cm大円形)を24wellプレートの各well底部においた後、それぞれに対して(1)の実験にて得られた濃縮5xCMを約0.15ml/cm<sup>2</sup>ずつ含浸させ約1時間静置した。また対照用として同様の方法にて作成した5倍濃縮D-MEM(5xD-MEM)を約0.15ml/cm<sup>2</sup>ずつを(2)の各フィルムに含浸させ約1時間静置し、結果以下実験群を作成した⑦CM含有鱗コラーゲン群⑧D-MEM含有鱗コラーゲン群⑨CM含有豚コラーゲン群⑩D-MEM含有豚コラーゲン群。(各n=2)

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学的検討

上述(3)の各実験群に対しそれぞれのwellに2%FBS含有DMEM培地2.0mlとラット角膜上皮細胞を5x10<sup>4</sup> cellを加えて培養を行い、7日目および14日目に各フィルムを10%ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋し、フィルムの切断面を顕微鏡的に観察をしその細胞増殖性や組織形成度等について検討を行った。

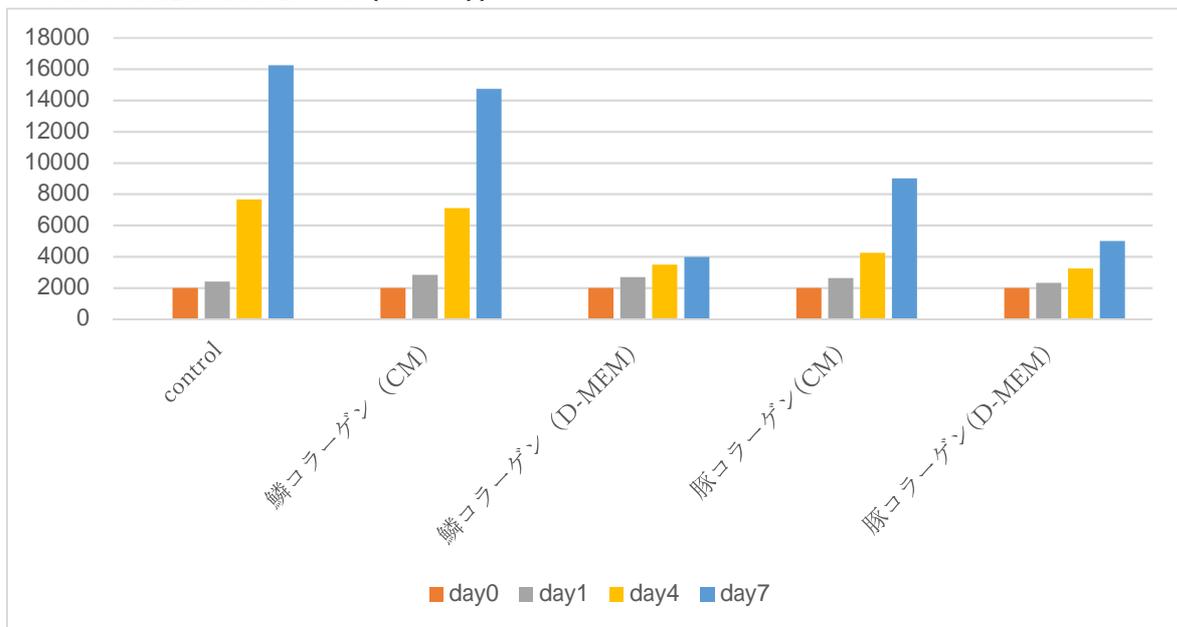
4. 研究成果

(1)羊膜幹細胞についての各種幹細胞 marker の発現の検討

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、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。

(2)CM 及び対象 D-MEM 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

前述の様に⑦CM含有鱗コラーゲン群⑧D-MEM含有鱗コラーゲン群⑨CM含有豚コラーゲン群⑩D-MEM含有豚コラーゲン群に対して、ラット角膜上皮細胞を加えて培養を行い、1,4,7日後経時的に、細胞数を測定した。(各n=3)



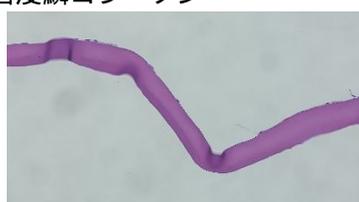
結果、上図の如く⑦CM含浸鱗コラーゲン群は⑨CM含浸豚コラーゲン群に比べて増殖性が良好であった。また⑦CM含浸鱗コラーゲン群および⑨CM含浸豚コラーゲン群は⑧D-MEM含浸鱗コラーゲン群および⑩D-MEM含浸豚コラーゲン群に対して増殖性が優れていることが分かった。

(3)CM 及び対象 D-MEM 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学的検討

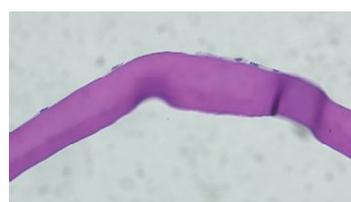
前述の様に⑦CM含有鱗コラーゲン群⑧D-MEM含有鱗コラーゲン群⑨CM含有豚コラーゲン群⑩D-MEM含有豚コラーゲン群に対して、ラット角膜上皮細胞を7および14日間培養を行った後フィルムを固定、パラフィン包埋後、各フィルムの切断面の観察を顕微鏡的に行い、その細胞の増殖性や組織形成度について検討を行った。さらに顕微鏡所見から各フィルム上の1cmあたりの細胞数をcountし比較を行った。

組織所見(各2w後)

⑦CM含浸鱗コラーゲン

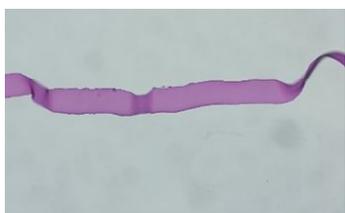


x 200

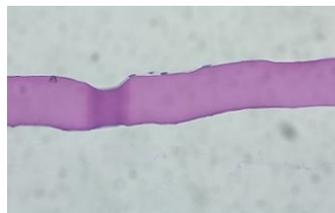


x 400

①D-MEM 含浸鱗コラーゲン

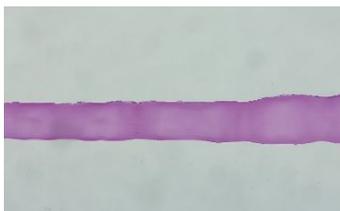


x 200

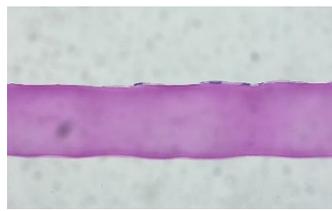


x 400

⑦CM 含浸豚コラーゲン



x 200



x 400

②D-MEM 含浸豚コラーゲン



x 200



x 400

結果、顕微鏡所見からは全体的に細胞数は多くなく比較的まばらであり、明らかな巣状変化や重層化等の所見は認められなかったが、⑦CM 含浸鱗コラーゲンや⑦CM 含浸豚コラーゲンにおいては①D-MEM 含浸鱗コラーゲンや②D-MEM 含浸豚コラーゲンより比較的細胞数が多いと思われた。その為以下の様に各顕微鏡所見から各フィルム上の 1cm あたりの細胞数を count し比較を行った。

組織所見から見た単位 (/cm) あたりの細胞数比較

	細胞数 ( cells/cm ) ( Ave±SD, n=2 )	
	1 W	2 W
⑦CM 含浸鱗コラーゲン	79.5±17.7	90±19.8
①D-MEM 含浸鱗コラーゲン	31.5±0.7	31.5±2.1
⑦CM 含浸豚コラーゲン	56.5±26.0	64±15.6
②D-MEM 含浸豚コラーゲン	28±7.1	33.5±26.2

結果、各フィルム上の細胞数は⑦CM 含浸鱗コラーゲン > ⑦CM 含浸豚コラーゲン > ①D-MEM 含浸鱗コラーゲン > ②D-MEM 含浸豚コラーゲンの順に多かった。

以上より鱗コラーゲンは従来の豚コラーゲンに比べ細胞の増殖性において優れていた。また CM は対象の D-MEM に比べても増殖性に優れており、鱗コラーゲンと CM とを組み合わせることでその効果を最良化することが出来たと考えられた。しかしながら細胞分化や組織形成性においては十分な効果は認められなかったことより今後も更なる改善が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 T Horii, H Tsujimoto, S Kageyama, T Yoshida, K Kobayashi, H Takamori, H Minato, J Ueda, A Hagiwara, H Ichikawa, A Kawauch	4. 巻 31(6)
2. 論文標題 The usefulness of re-attachability of anti-adhesive cross-linked gelatin film and the required physical and biological properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 351 - 360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/BME-206009	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 T Horii, H Tsujimoto, A Hagiwara, N Isogai, Y Sueyoshi, Y Oe, S Kageyama, T Yoshida, K Kobayashi, H Minato, J Ueda, H Ichikawa, A Kawauchi	4. 巻 4(9)
2. 論文標題 Effects of Fiber Diameter and Spacing Size of an Artificial Scaffold on the In Vivo Cellular Response and Tissue Remodeling.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 6924-6936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsabm.1c00572	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 堀井 常人, 萩原 明郎, 辻本 洋行, 上仁 数義, 影山 進, 吉田 哲也, 小林 憲市, 富田 圭司, 窪田 成寿, 永澤 誠之, 河内 明宏
2. 発表標題 膀胱拡大術に対する羊膜と足場材料P(LA/CL)による機能的膀胱の再生
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀井 常人, 萩原 明於, 上仁 数義, 辻本 洋行, 影山 進, 吉田 哲也, 富田 圭司, 村井 亮介, 窪田 成寿, 河内 明宏
2. 発表標題 膀胱拡大術における羊膜と足場材料P(LA/CL)を用いた機能的膀胱の再生
3. 学会等名 第27回日本排尿機能学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀井常人, 萩原 明郎, 辻本 洋行, 上仁 数義, 影山 進, 吉田 哲也, 河内 明宏
2. 発表標題 生体吸収性 PGA 不織布の繊維間隔による細胞浸潤の違いと組織再生への影響
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Horii, H. Tsujimoto, K. Jonin, M. Nagasawa, K. Kobayashi, T. Takagi, Y. Ikada, A. Hagiwara, A. Kawauchi
2. 発表標題 Physical and biological properties of newly developed thermally cross-linked gelatin film for anti-adhesion material
3. 学会等名 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Horii, K. Jonin, H. Tsujimoto, M. Nagasawa, K. Kobayashi, A. Hagiwara, A. Kawauchi
2. 発表標題 Regeneration of functional bladder using cell seeded amniotic membrane and P(LA/CL) scaffold covered with omentum
3. 学会等名 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀井常人, 萩原明郎, 辻本洋行, 上仁数義, 影山進, 吉田哲也, 富田圭司, 村井亮介, 馬杉美和子, 窪田成寿, 永澤誠之, 河内明宏
2. 発表標題 羊膜と足場材料 P(LA/CL)を用いた機能的膀胱の再生
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀井常人, 萩原明郎, 辻本洋行, 影山進, 吉田哲也, 河内明宏
2. 発表標題 生体吸収性PGA不織布の繊維径と繊維間隔の違いによる細胞浸潤と組織形成への影響
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会、第8回アジアバイオマテリアル学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	萩原 明郎  (HAGIWARA Akeo)  (90198648)	滋賀医科大学・泌尿器科・客員教授   (14202)	
連携研究者	堀井 常人  (HORII Tsunehito)  (70838458)	滋賀医科大学・泌尿器科・教務補佐員   (14202)	

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
---------	---------