

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462002

研究課題名(和文) 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開発

研究課題名(英文) Development of safer and more useful materials for regenerative medicine mimicking the properties of amniotic membrane

研究代表者

辻本 洋行 (Tsujiyama, 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：優れた再生医療材料である羊膜の特性を模倣し、かつより安全で機能的な再生医療材料を製作するための基礎的検討を行った。本研究においては、羊膜幹細胞の培養上清(Conditioned Medium:CM)をアルカリ処理や酸処理ゼラチンまたその混合物に含浸させて作成した材料の癒着防止や腹膜再生効果について検討を行った。培養実験の結果から、CMは中皮細胞の増殖を促進する効果を有し、CMを5-10倍程度濃縮することでその効果を向上できることが分かった。ラットでの盲腸癒着モデル実験の結果より、濃縮CMを含浸させたアルカリ処理ゼラチンゼラチンをfreeze dryしたものの効果が最も優れていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We performed the basic study to create more safe and functional materials, which are mimicking amniotic membrane as an excellent material for regenerative medicine. In this study, we investigated the effects of anti-adhesion and peritoneal regeneration for the membrane made of alkali- or acid-treated gelatin or their complexes, containing the culture medium of stem cells established from amniotic membrane (conditioned medium: CM). The culture studies showed that CM promoted the growth of mesothelial cells and that it was more effective to condense CM at 5-10 times. From the studies using rat cecum adhesion model, the freeze dry membrane made of alkali-treated gelatin with condensed CM had most excellent anti-adhesive effect and peritoneal regeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医学 羊膜)再生医療材料 実験外科学

1. 研究開始当初の背景

国内外の研究動向：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。

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

そこで我々は前述のような羊膜の特性を持ち、加工性に優れより安全な、機能的な再生医療材料を作製し、その臨床応用例として、高度の皮膚欠損創に対する足場材料や、腹部手術における損傷腹膜の修復再生を行う癒着防止材として用いるための基礎的検討を動物モデルを用いて行う事が目的である。特に本研究では、羊膜幹細胞の培養上清(Conditioned Medium:CM)をアルカリ処理や酸処理ゼラチンもしくはその混合物に含浸させて作成した材料の癒着防止や腹膜再生効果について検討を行った。

3. 研究の方法

I. 材料の作成

1) 羊膜幹細胞の単離とCMの採取

妊娠ラット(Wister S/T, 18日目)から羊膜を採取し、Trypsin 処理法にて羊膜上皮幹細胞除去後、その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D-MEM培地にて培養を行った。

単離・培養した羊膜幹細胞についてCD11b, 29, 31, 44, 45, 90, 105等の各抗体を用いてのフローサイトメトリー解析や、Oct3/4, Sox2抗体による蛍光免疫染色を行い、stem cell marker や分化 marker の発現について検討を行った。

stem cell marker 陽性且つ各分化 marker 陰性であることを確認した羊膜幹細胞の培地を無血清DMEM培地に交換し、48時間培養を行った後培養上清を採取し、Conditioned Medium(以下CM)を採取した。更にCMを濃縮カラム(ビバスピ^R、サルトリウス)を用いてx5, x10濃縮したものも作成した。

2) CM含浸羊膜模倣ゼラチン癒着防止材

アルカリ処理ゼラチン(メディゼラチン^R、ニッピ)および酸処理ゼラチン(ハイグレードゼラチン^R、ニッピ)水溶液およびその各100/0、80/20、60/40、40/60、20/80、0/100%の混合物をシャーレ上で風乾し厚さおよそ約0.03mlのフィルムを作成し、約5時間真空下に乾熱滅菌を行い熱架橋した。

各熱架橋フィルムに前述の各CMを約0.05ml/cm²ずつ含浸させ約1時間静置した。さらに同様の処理を行った各フィルムを一晚-80度で凍結後、一晚凍結乾燥を行いfreeze dryしたものも作成した。

II. *in vitro* 実験

1) 実験1(CM効果の評価と血清濃度の決定)

ラット(Wister S/T、雌、8週令)の腹膜組織から単離培養した腹膜中皮細胞を5x10⁴ cellを24ウェル培養用プレートの各ウェルに入れ、0%及び2%FBS含有DMEM培地0.4mlを加えた。さらに各ウェルに1)CM 2)DMEM培地 3)無添加(control)をそれぞれ1/6量ずつ加えて培養を行い、1, 3, 5, 7日後細胞数を測定し経時的にその増殖を測定した。(n=4)

2) 実験2(濃縮CMの効果の評価)

ラット腹膜中皮細胞を5x10⁴ 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)CM 2)5xCM 3)10xCM また4)DMEM培地 5)5xDMEM 6)10xDMEM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測定した。(n=4)

3) 実験3(CM含浸各フィルムの効果の評価)

前述の100/0、80/20、60/40、40/60、20/80、0/100%各ゼラチンフィルムを24ウェル培養用プレートのウェルに設置後、2%FBS含有DMEM培地0.4mlを加えた。10xCMを約1/6量ずつ加えてフィルム無(control)と共に培養を行い、1, 3, 5, 7日後細胞数を測定し経時的にその増殖を測定した。(n=4)

III. *in vivo* 実験

Wister S/Tラット(雌、8週令)を全麻下に開腹し、その盲腸壁を紙ヤスリにて擦過し、癒着モデルを作成した。

1) 実験1(CM濃度とfreeze dry法の評価)

前述の熱架橋アルカリ処理ゼラチンフィルム(100/0%)を3x2cmサイズに切離し、1)DMEM 2)CM 3)10xCMをそれぞれ約0.3mlずつ含浸させ約1時間静置した。さらに4)10xCMを同様に含浸したフィルムをfreeze dryしたものをそれぞれラット癒着モデルに貼付し、4)無貼付(control)と共に3週後、犠牲死させた後、再開腹しその癒着の範囲や程度を後述の癒着評価スコアを用いて評価した。さらに、腹膜組織再生について病理組織学的に評価した。(n=4)

2) 実験2(各ゼラチン配合比の評価)

前述の100/0、80/20、60/40、40/60、20/80、

0/100%各ゼラチンフィルムを 3x2cm サイズに切離し、それぞれに 10xCM を約 0.3ml ずつ含浸させ約 1 時間静置した後、さらに freeze dry したものをそれぞれラット癒着モデルに貼付し、4) 無貼付 (control) と共に 3 週後、犠牲死させた後、再開腹しその癒着の範囲や程度を後述の癒着評価スコアを用いて評価した。さらに、腹膜組織再生について病理組織学的に評価した。(n=3)

3) 実験 3 (濃縮 CM 含浸 freeze dry ゼラチン性癒着防止材の評価)

前述の熱架橋アルカリ処理ゼラチンフィルムを 3x2cm サイズに切離し、1) DMEM 2) 10x DMEM 3) CM 4) 10xCM をそれぞれ約 0.3ml ずつ含浸させ約 1 時間静置した後、freeze dry したものをそれぞれラット癒着モデルに貼付し、5) 無貼付 (control) と共に 3 週後、犠牲死させた後、再開腹しその癒着の範囲や程度を後述の癒着評価スコアを用いて評価した。さらに、腹膜組織再生について病理組織的に評価した。(n=3)

癒着評価 score

<癒着の範囲>

- 0=癒着なし
- 1=処置面積の 1-25%
- 2=処置面積の 26-50%
- 3=処置面積の 51-75%
- 4=処置面積の 76-100%

<癒着の程度>

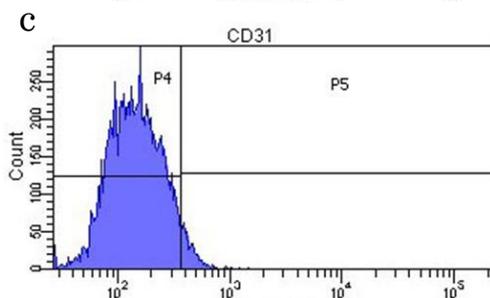
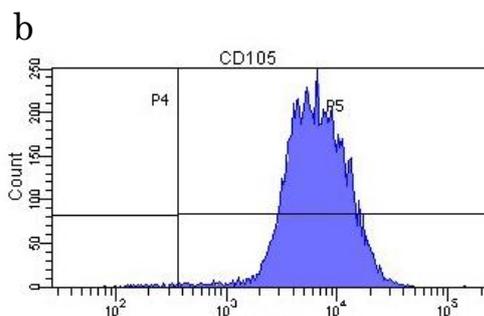
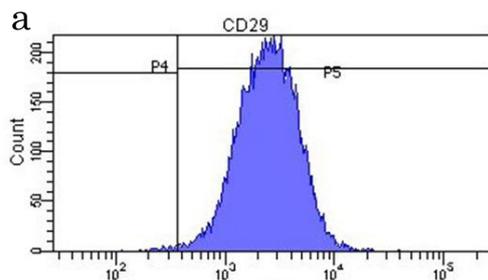
- 0=癒着なし
- 1=牽引で自然にはがれる
- 2=力を加えた剥離が必要
- 3=剥離に漿膜損傷を伴い、50%以下の鋭的剥離が必要
- 4=剥離に漿膜損傷を伴い、50%以上の鋭的剥離が必要

4. 研究成果

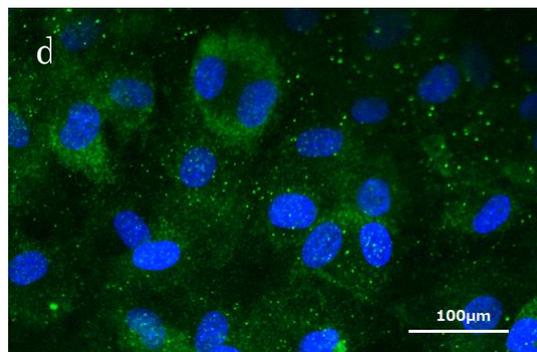
I. 各材料の性状

1) 羊膜幹細胞の性状と CM の採取

単離培養された羊膜幹細胞は、フローサイトメトリーの解析にて同細胞は CD29(+) (図 a)、CD44(+), CD105(+) (図 b) であり幹細胞マーカーは陽性であった。一方 CD11b(-)、CD31(-) (図 c)、CD45(-)、CD90(-) で血球系や血管系のマーカーは陰性であった。



また免疫染色にて Oct3/4(+) (図 d)、Sox2(+) であった。



これらの性質は初代培養から少なくとも 7 代程度までの継代培養細胞において確認できた。以上より本実験においては羊膜幹細胞は初代培養後 5 代までのものを用いて実験することとし、前述の CM の採取やその後の CM の濃縮を行った。

1) CM 含浸ゼラチン性癒着防止材の性状

各配合比のゼラチン性癒着防止材は、CM を含浸させるとその性状が軟弱化し、特に酸性ゼラチンの含有が高いものでは著名であった。またラットの盲腸癒着モデルの腹膜擦過部に試験的に貼付したところ、接着性が低下した。

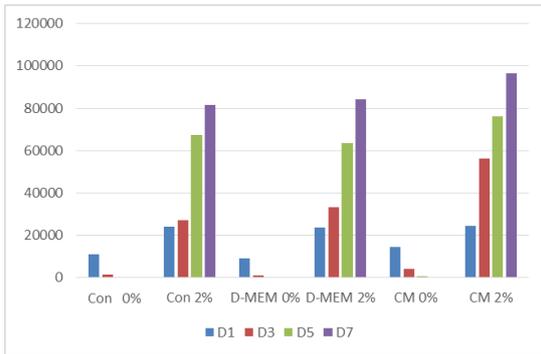
そこで CM を含浸させた後、freeze dry を行ったところ、各材料の軟弱化は改善された。また接着性についても改善が認められた。

II. *in vitro* 実験

1) 実験 1 (CM 効果の評価と血清濃度の決定)

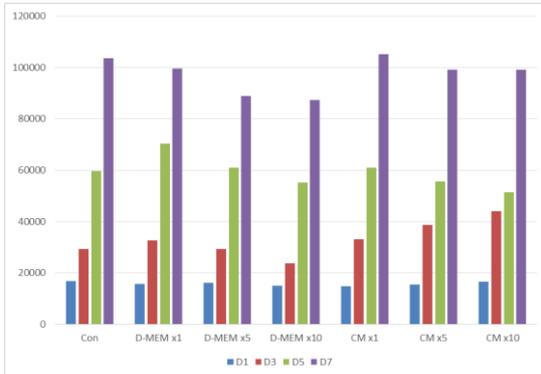
下図に示すように、CM を添加した場合は、control (無添加) や DMEM (DMEM 培地追加) に比べ中皮細胞のより良好な増殖を認めた。この傾向は無血清および 2% 低血清下の何れにおいても認められたが、2% 低血清下においてより顕著であった。無血清の場合細胞自体が減少してしまうこと、生体の腹腔内には血

清成分が多少なりとも存在することから、以降の培養実験においては2%低血清下にて行う事とした。



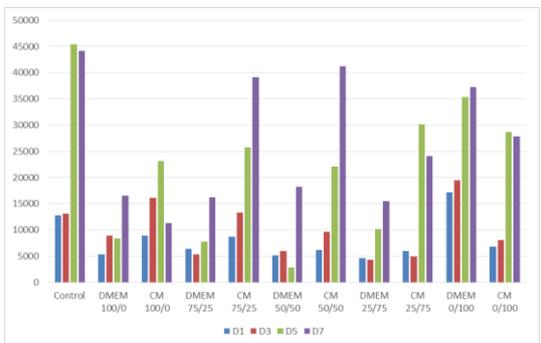
2) 実験 2(濃縮 CM の効果の評価)

下図に示すように、何れの CM の濃度においても CM を添加した場合は、DMEM 培地を添加した場合に比べ中皮細胞のより良好な増殖を認めた。この傾向は 5xCM や 10xCM を添加した場合においてより顕著に認められた。以上より以降の培養実験においては 10xCM を使用する事とした。



2) 実験 3(CM 含浸各フィルムの効果の評価)

下図に示すように、配合比 0/100 以外のフィルムにおいては何れも 10xCM を添加した場合は、10xDME 培地を添加した場合に比べ中皮細胞のより良好な増殖を認めた。しかしながら特に配合比 75/25 や 50/50 においては最も良好な増殖を認めた。

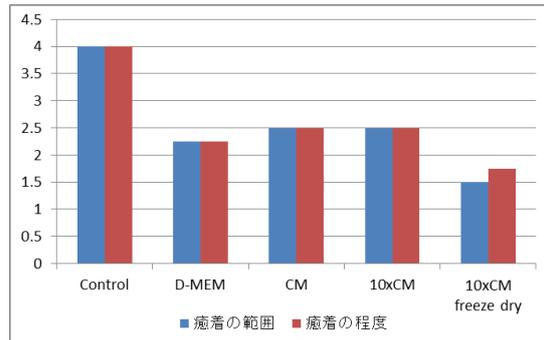


III. *in vivo* 実験

1) 実験 1(CM 濃度と freeze dry 法の評価)

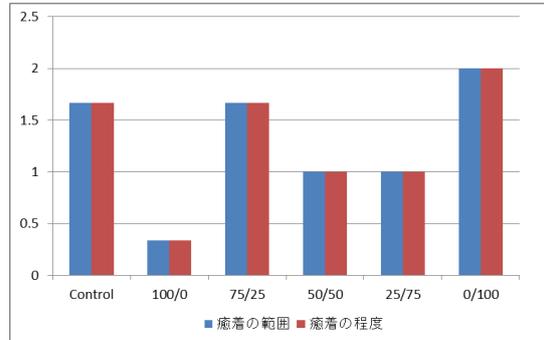
下図に示すように、DMEM、CM、10xCM 何れも control 群に比べて癒着防止効果を示したが、殆ど差は認めなかった。一方 freeze dry にした場合は、創部への接着性は良くなり、

また癒着防止効果もより良好であった。以上より実験 2 の癒着防止実験においては 10xCM および freeze dry を使用する事とした。



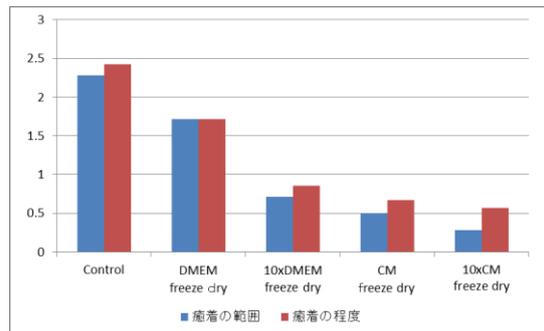
2) 実験 2(各ゼラチン配合比の評価)

下図に示すように、各ゼラチンの配合比での効果は、配合比 100/0(アルカリ処理ゼラチン 100%)の場合において、もっとも良好な癒着防止効果を示した。以上より実験 3 においては配合比 100/0 のフィルムを用いて実験を行うこととした。



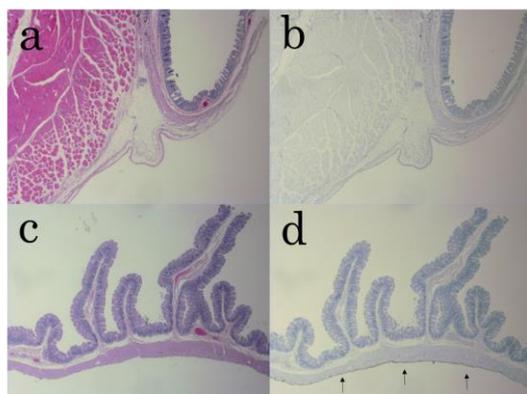
3) 実験 3(濃縮 CM 含浸 freeze dry ゼラチン性癒着防止材の評価)

下図に示すように、CM freeze dry、10xCM freeze dry 群は、DMEM freeze dry、10xDMEM freeze dry 群に比べてより良好な癒着防止効果を示した。中でも 10xCM freeze dry 群は最も良好な癒着防止効果を示した。



4) 組織学的観察

組織的評価は HE 染色および腹膜中皮に特異的な HBME1 染色にて行った。In vivo 実験の各 1-3 実験において、癒着の多い症例は腹膜の再生度は低く(a, b: control, a: HE 染色 b: HBME 染色)、一方癒着の少ない症例は腹膜の再生はより良好であった。(c, d: 10xCM 含浸 freeze dry alkali-treated gelatin, c: HE 染色 d: HBME 染色 ↑再生腹膜)。



IV. 考察

以上の検討から次の事が考察された。

培養実験の結果より①CMは腹膜中皮細胞に対して増殖を促進する作用がある②その効果はCMを5-10倍程度濃縮することでより効果を示す③CM含浸したアルカリ処理ゼラチンと酸処理ゼラチンの配合比率は75/25や50/50において、より効果を示すことが分かった。

一方ラットでの癒着防止実験の結果より、①濃縮CM含浸したアルカリ処理ゼラチンゼラチンを②freeze dryしたものが最も優れた癒着効果や腹膜再生効果を示すことが分かった。

しかしながら今後も更なる実験的検討や技術的な改良工夫を行ってゆく必要があると思われた。

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7件))

- ① Tsujimoto H, Tanzawa A, Miyamoto H, Horii T, Tsuji M, Kawasumi A, Tamura A, Wang Z, Abe R, Tanaka S, Yamanaka K, Matoba M, Torii H, Ozamoto Y, Takamori H, Ikada Y, Hagiwara A. Biological properties of a thermally crosslinked gelatin film as a novel anti-adhesive material: Relationship between the biological properties and the extent of thermal crosslinking. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 査読有, 103(7), 2015, 1511-1518, DOI:10.1007/s00595-013-0608-3
- ② Matoba M, Hashimoto A, Tanzawa A, Orikasa T, Ikeda J, Iwame Y, Ozamoto Y, Abe R, Miyamoto H, Yoshida C, Hashimoto T, Torii H, Takamori H, Morita S, Tsujimoto H, Hagiwara A. Prevention of polyglycolic acid-induced peritoneal adhesion using alginate in a rat model, *BioMed Res Int*, 査読有, 2015, 403413, DOI: 10.1155/2015/403413

- ③ Tsujimoto H, Takamori H, Tsuji M, Hayashi M, Ikeda J, Orikasa T, Torii H, Ozamoto Y, Suzuki S, Morita S, Ikada Y, Hagiwara A. Development of gelatin flakes, a new type of anti-adhesive material: a preliminary study of in vivo rat adhesion model. *Surgery Today*, 査読有, 44(2), 2014, 391-394, DOI: 10.1007/s00595-013-0608-3
- ④ Horii H, Tsujimoto H, Miyamoto H, Ikeda J, Orikasa T, Narita K, Takamori H, Morita S, Urabe M, Nakamachi E, Hagiwara A. A preliminary study of the physical properties of a new anti-adhesive material made of thermally cross-linked gelatin film. *同志社大学理工学研究報告、査読無*, 54, 2013, 52-58
- ⑤ Miyamoto H, Tsujimoto H, Horii H, Ikeda J, Orikasa T, Takamori H, Torii H, Ozamoto Y, Morita S, Urabe M, Hagiwara A. The effect of thermally cross-linked gelatin film on intraperitoneal dissemination of cancer cells -A In vitro study using human gastrointestinal cancer cell lines-. *同志社大学理工学研究報告、査読無*, 54, 2013, 16-20
- ⑥ Kawasumi A, Wang Z, Kotani Y, Tamura A, Tsuji M, Hayashi M, Ikeda J, Orikasa T, Takamori H, Torii H, Ozamoto Y, Morita S, Tsujimoto H, Urabe M, Hagiwara A. New scaffolds for tissue engineering using adipose-derived stem cells. *同志社大学理工学研究報告、査読無*, 54, 2013, 41-51
- ⑦ Kotani Y, Wang Z, Tamura A, Kawasumi A, Tsuji M, Hayashi M, Ikeda J, Orikasa T, Takamori H, Torii H, Ozamoto Y, Morita S, Tsujimoto H, Urabe M, Hagiwara A. *同志社大学理工学研究報告、査読無*, 54, 2013, 66-74

[学会発表] (計8件)

- ① 辻本洋行、宮本博恵、堀井常人、山中皓暉、韓沛、阿部里恵、田中翔大、小座本雄軌、鳥井裕子、竹本洋一、鈴木周子、高森秀樹、森田真一郎、筏義人、萩原明郎. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 -熱架橋 gelatin film とその応用-. 第37回日本バイオマテリアル学会. 2015.11.9-10 (京都市、京都テルサ)
- ② 辻本洋行、堀井常人、宮本博恵、山中皓暉、阿部里恵、田中翔大、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、萩原明郎. 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23回日本消

化器関連学会週間(JDDW). 2015. 10. -11 (東京都、グランドプリンスホテル新高輪)

- ③ 辻本洋行、高森秀樹、宮本博恵、堀井常人、辻美咲、小座本雄軌、鳥井裕子、鈴木周子、森田真一郎、筏義人、萩原明郎. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 -熱架橋 gelatin film とその応用-. 第 22 回日本消化器関連学会週間(JDDW). 2014. 10. 23-26 (神戸市、神戸国際会議場)
- ④ 辻本洋行、高森秀樹、吉田千子、宮本博恵、堀井常人、辻美咲、池田潤基、折笠太一、御座本雄軌、鳥井裕子、竹本洋一、鈴木周子、森田真一郎、筏義人、萩原明郎. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 -再生医療の手法の汎用化をめざして-. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014. 4. 3-5 (京都市、京都国際会議場)
- ⑤ 辻本洋行、高森秀樹、吉田千子、宮本博恵、堀井常人、辻美咲、池田潤基、折笠太一、小座本雄軌、鳥井裕子、鈴木周子、平嗣良、森田真一郎、筏義人、萩原明郎. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 -再生医療の手法の汎用化をめざして-. 第 13 回日本再生医療学会総会 2014. 3. 4-6 (京都市、京都国際会議場)
- ⑥ 辻本洋行、高森秀樹、辻美咲、池田潤基、折笠太一、吉田千子、宮本博恵、堀井常人、小座本雄軌、鳥井裕子、鈴木周子、森田真一郎、筏義人、萩原明郎. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 -腹腔鏡手術に応用可能な新規癒着防止材 gelatin flake の特性について-. 第 21 回日本消化器関連学会週間(JDDW). 2013. 10. 9-12 (東京都、グランドプリンスホテル新高輪)
- ⑦ 辻本洋行、高森秀樹、辻美咲、池田潤基、折笠太一、吉田千子、宮本博恵、堀井常人、小座本雄軌、鳥井裕子、鈴木周子、森田真一郎、筏義人、萩原明郎. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 -腹腔鏡手術に応用可能な新規癒着防止材. 第 34 回日本炎症・再生医学会. 2013. 7. 2-3 (京都市、京都国際会議場)
- ⑧ 辻本洋行、丹澤あゆみ、吉田千子、堀井常人、宮本博恵、折笠太一、池田潤基、高森秀樹、鳥井裕子、小座本雄軌、鈴木周子、森田真一郎、竹本洋一、筏義人、萩原明郎. 新規癒着防止材熱架橋 gelatin film の物理的・生物学的特性 -架橋度と癒着防止効果の関係について-. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013. 4. 11-13 (博多市、福岡国際会議場)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

萩原 明郎 (HAGIWARA AKEO)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号：90198648

(3) 連携研究者

()

研究者番号：