

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591672

研究課題名（和文）5型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖が有する癒着防止に関する新機能の解明とその応用研究課題名（英文）The elucidation of mechanisms for Collagen Type V  $\alpha 3$  chains anti-organ adhesion function and there application.

研究代表者

住吉 秀明（SUMIYOSHI HIDEAKI）

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：60343357

研究成果の概要（和文）：癒着は手術による創傷刺激に対して起こる組織線維症であり、術後の機能回復と患者の QOL 維持に影響する。本研究により希少コラーゲン分子である V 型コラーゲン $\alpha 3$ （以下 $\alpha 3(V)$ ）が創傷部線維化の初期に発現し癒着を防止していること、 $\alpha 3(V)$ の存在するコラーゲン線維は低密度で細い形態をしていること、抗癒着効果の機序として、コラーゲン分子の集束を直接阻害すると考えられること等が明らかとなった。 $\alpha 3(V)$ 抗癒着活性は有効な癒着防止治療に応用できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Organ adhesion were one case of excess tissue fibrosis caused wound healing after operation. Organ adhesion has bad influences for functional recovery and patients QOL. In this study elucidated that, minor component of collagen Type V  $\alpha 3$  chain ( $\alpha 3(V)$ ) has anti tissue adhesion and fibrosis activity and specific expression in early time wound tissue. In  $\alpha 3(V)$  rich regions collagen fiber observed thin and soft shapes. The idea for  $\alpha 3(V)$  anti-fibrosis activity were inhibited collagen banding step directly for any data from this study.  $\alpha 3(V)$  could very promising material for organ adhesion blocking treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：実験外科学、癒着防止、抗線維化、V型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖

## 1. 研究開始当初の背景

癒着は手術の創傷刺激によって惹起される組織線維化症である。創傷治癒過程における組織の線維化は本来、正常な組織修復の過

程であるが、これが正常にコントロールされない場合、周囲の組織を巻き込んで広範な接着を起こし、組織の回復と機能を妨げる。癒着は術後9割に起こるとされ、患者の QOL

を下げるに留まらず、命を脅かす場合もあり、そのコントロールは手術の成否を左右するものである。本研究課題である V 型コラーゲン $\alpha 3(V)$ 鎖（以後 $\alpha 3(V)$ と表記）は胎児の筋膜、腹膜、臍の緒、羊膜等、柔らかい膜様組織に含まれるが、成体では殆ど見られない希少コラーゲン分子種である。我々は、その局在と性状について、解析と報告を行ってきた。その中で、マウスの皮膚創傷治癒過程において、 $\alpha 3(V)$ が各種コラーゲン遺伝子の活性化する初期に、一過性に発現しているのが見出された。また発現部位においても深部皮下と筋膜の境界面等、限られた領域で特異的に発現し、治癒後の筋層に対する癒着は見られなかった。対して、創傷が筋層より深い部位に及んだ場合では、 $\alpha 3(V)$ の発現は殆ど無く、癒着の発生が多く見られた。電子顕微鏡によって $\alpha 3(V)$ の多く発現する領域を観察すると、コラーゲン線維の形態は太い線維と細い線維が混在しており、全体的にばらけた構造だった。これに対し $\alpha 3(V)$ の少ない領域の組織ではコラーゲン線維が規則性に整列して配向し、移行期の細い線維は殆ど見られなかった。これらのことから、 $\alpha 3(V)$ がコラーゲン線維中に含まれることで、コラーゲン線維の形成に変化を与え、結果として癒着や線維化を起し難くしていることが示唆された。

本実験課題は、この $\alpha 3(V)$ の持つ抗癒着活性を確認し、その作用機序を解明することによって、術後癒着の治療に役立てることを目的として計画された。

## 2. 研究の目的

### 2009 年度

(1) マウスを用いた手術癒着モデルを作成し、新規コラーゲン $\alpha 3(V)$ の発現領域と癒着防止活性の因果関係の確認を行う。

(2)  $\alpha 3(V)$ 鎖の機能的な抗体を作製する。

(3)  $\alpha 3(V)$ を発現し、癒着を起しにくい領域の線維芽細胞について、細胞特性的な相違があるか調べる。

### 2010 年度

(4)  $\alpha 3(V)$ が癒着防止に果たす分子的機序について検討する。

①2009 年に作製した抗 $\alpha 3(V)$ 抗体を免疫組織学的な観察と免疫電顕に用いる。

②ヘパリン硫酸糖鎖等、 $\alpha 3(V)$ と結合親和性のある分子群の局在の変化について調べる。  
(5)  $\alpha 3(V)$ 全長 cDNA ミニジーンを作製し、強制発現細胞株を作製する。

### 2011 年度

(6)  $\alpha 3(V)$ 鎖の多く含まれるコラーゲン組織とそうでない組織についてコラーゲン線維形成と抗線維化、 $\alpha 3(V)$ 鎖の分子内局在の関係についてさらに精査する。

## 3. 研究の方法

### 2009 年度

(1) マウスを用いた手術・癒着モデル。

① マウスの筋層を切開し、絹糸を体内に残して縫合する。皮膚側では浅筋膜結合組織より、 $\alpha 3(V)$ 成分に富むコラーゲンが産生され、体腔内部では $\alpha 3(V)$ 成分に乏しいコラーゲンが産生されることが示されている。それぞれの側での $\alpha 3(V)$ 鎖の発現を *in-situ hybridization* で確認し、 $\alpha 3(V)$ 鎖の発現と癒着の発生を観察した。

②  $\alpha 3(V)$ 鎖を多く発現する部位におけるコラーゲン線維形成の形態、コラーゲン線維集束の推移を電子顕微鏡下で観察した。

(2)  $\alpha 3(V)$ 鎖の一部のドメインを融合タンパクとして遺伝子工学的に作製し、ラットを免疫することによって抗体を作製した。

(3) 浅筋膜結合組織由来細胞、骨髄由来間葉細胞、肉芽組織線維芽細胞の分離を行った。

### 2010 年度

(4) ①作製された抗体を用いて $\alpha 3(V)$ 鎖の組織染色を行った。抗体は *in-situ hybridization* の連続切片で比較を行い、妥当性を検討した。妥当な抗体は免疫電顕にも使用された。

②  $\alpha 3(V)$ とヘパリン硫酸との局在について抗ヘパリン硫酸糖鎖抗体を用いて $\alpha 3(V)$ との相互作用の有無について調べた。

(5) 培養線維芽細胞株に $\alpha 3(V)$ 発現ベクターを導入し、コラーゲンスポンジの中で生育させた。後にスポンジごと固定、包埋、薄切を行い、電子顕微鏡で観察を行った。

### 2011 年度

(6) ① $\alpha 3(V)$ を生来多く含む、臍帯・羊膜組織と $\alpha 3(V)$ 発現のない真皮コラーゲンにおいて、 $\alpha 3(V)$ 、ヘパリン硫酸鎖の局在とコラーゲン線維の集束会合状態について比較を行った。

②2010 年度に $\alpha 3(V)$ が多く配置しているコラーゲン組織にヘパリン硫酸鎖が共局在していることが示されたため、さらにコラーゲン組織に多く含まれるデルマトン硫酸鎖についても免疫組織観察、免疫電顕を行った。

#### 4. 研究成果

2009年度

下図に創傷治癒における $\alpha 3(V)$ の時期、部位特異的な発現の in-situ hybridizationを示した。

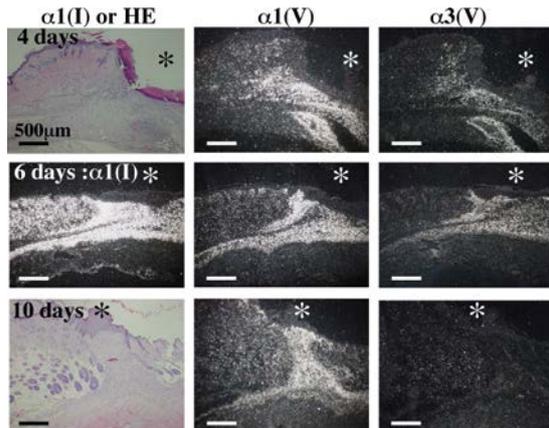


Fig.1 皮膚創傷事例のコラーゲン発現。

I 型コラーゲン ; $\alpha 1(I)$ と、通常V型コラーゲン ; $\alpha 1(V)$  : (左,中縦列)は創傷部全体に発現するが、 $\alpha 3(V)$ は初期(4~6日)にかけて一過性に発現し、発現部位も筋膜と、創傷部辺縁に限局する。\*は創傷部位。

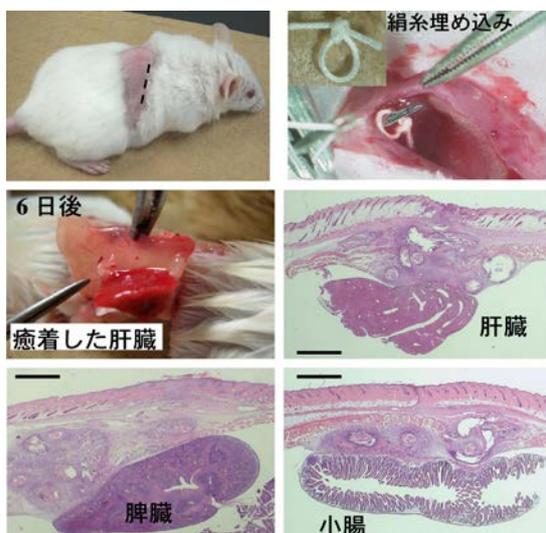


Fig.2 マウスを用いた手術・癒着モデル。

(1) ①マウス背部皮膚と筋層を切開し、絹糸を用いて筋上と体腔内部とにそれぞれ結び目を残すように縫合し治癒させた。結果、体腔内部側では肝臓、脾臓、小腸、卵巣、脂肪

組織等広範な臓器の癒着が確認できた。

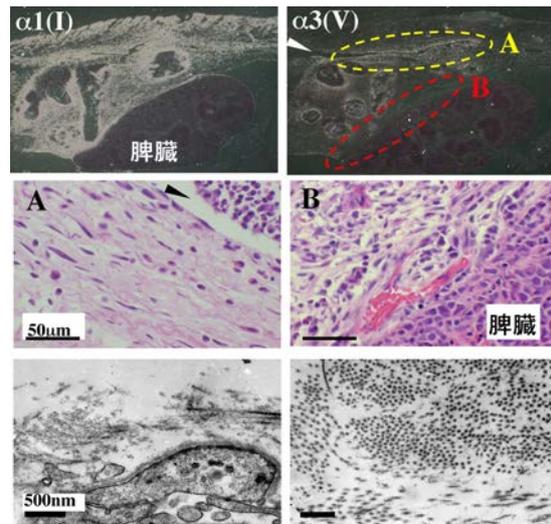


Fig.3 癒着例における $\alpha 3(V)$ の発現。

②癒着を起こした部位で in-situ hybridizationによりコラーゲン発現を型別に調べたところ、I 型コラーゲンは全体的に高発現が見られたが、 $\alpha 3(V)$ の発現は限局的で癒着面では特に少なく(B)、縫合糸の周りに少し見られるだけであった。一方、皮下の筋膜付近では隙間(矢頭)が見られ癒着が抑えられていた。その分離層境界面に特に強い $\alpha 3(V)$ の発現が確認できた(A)。電子顕微鏡によるコラーゲン組織を観察では(最下段)、 $\alpha 3(V)$ の発現の多い部位ではコラーゲン線維は低密度でコラーゲン表面に不定形の電子密度の高い物質が絡みついている所見が見られ(下段左)、細い線維も多く見られた。対して癒着を起こしている部位の肉芽組織では、太くて滑らかなコラーゲン線維が規則正しく形成される傾向があった(下段右)。

(3) 細胞の単離。筋膜結合組織からコラーゲナーゼ消化によって線維芽細胞を単離し、この細胞が $\alpha 3(V)$ を発現していることをRT-PCRによって確認した。骨髄由来FibrocyteのマーカーとされるCD13の発現は確認できなかった。皮膚創傷において、筋膜の線維芽細胞が主なる $\alpha 3(V)$ を供給している細胞であると考えられた。

2010年度

(2) 2009年度に $\alpha 1(V)$ と $\alpha 3(V)$ の融合タンパク質を抗原としてラットによって抗体作製を行った。その結果、in-situ hybridizationの組織分

布とよく合致する染色パターンの一組の抗体を得ることが出来た。

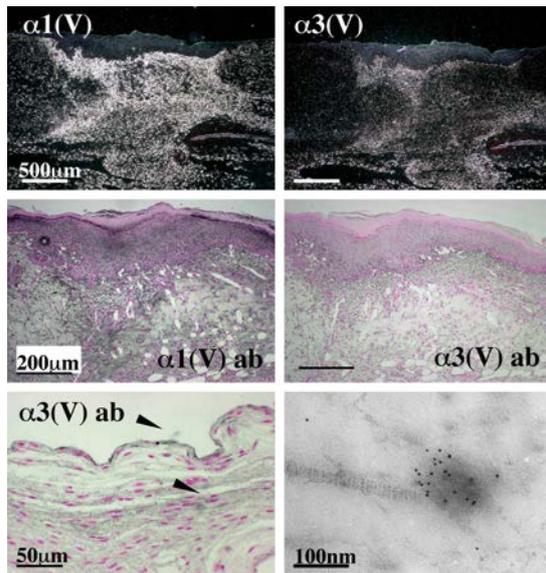


Fig. 4 抗 $\alpha 3(V)$ 抗体の免疫染色。

(4) ①上段は $\alpha 1(V)$ と $\alpha 3(V)$ の in-situ hybridization 中段は対応する免疫染色であり金コロイドを硝酸銀によって増感する物理現象法によって高感度に染色出来た。これによって、実際のコラーゲン分子としての $\alpha 3(V)$ 鎖を追跡できるようになった。下段左は創傷部に生じた隙間の剥離面(矢頭)で、 $\alpha 3(V)$ が層を成して局在していた。免疫電子顕微鏡にも抗体を適用したところ、 $\alpha 3(V)$ 抗体はコラーゲン線維束内になく、線維表面に付着する不整形の領域に反応した(下段右図)。

② $\alpha 3(V)$ に親和性の高いヘパリン硫酸鎖の抗糖鎖抗体による免疫染色を行った。

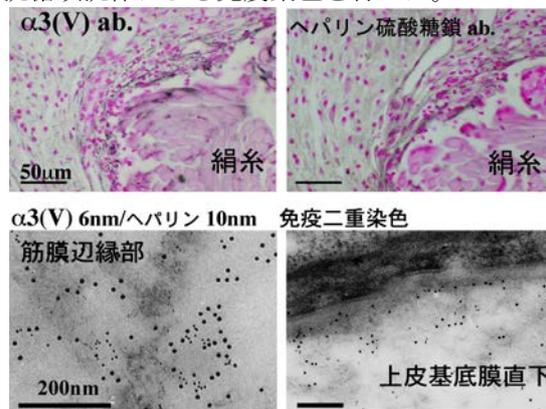


Fig.5  $\alpha 3(V)$ とヘパリン硫酸の共局在。

ヘパリン硫酸鎖は $\alpha 3(V)$ に富む、創傷部・筋膜辺縁、剥離面、上皮直下等に沿って局在することが示された。意外なことにヘパリン硫酸鎖は通常のコラーゲン組織にはあまり含

まれていなかった。さらに電子顕微鏡上でも $\alpha 3(V)$ とヘパリン硫酸がコラーゲン線維に付着する不整形の領域に分子会合体レベルで共局在していることが示された。これらから、 $\alpha 3(V)$ とヘパリン硫酸はインタラクションしながら、コラーゲン線維束に取り込まれず、直接コラーゲン線維集束を障害することにより抗線維化効果を現すことが考えられた。

2011 年度

(6) ①生来、常時 $\alpha 3(V)$ を多く含む臍帯、羊膜を用いて、確立された抗 $\alpha 3(V)$ 抗体を用いてヘパリン硫酸との共局在と線維集束形態を電子顕微鏡観察を含めて検証した。

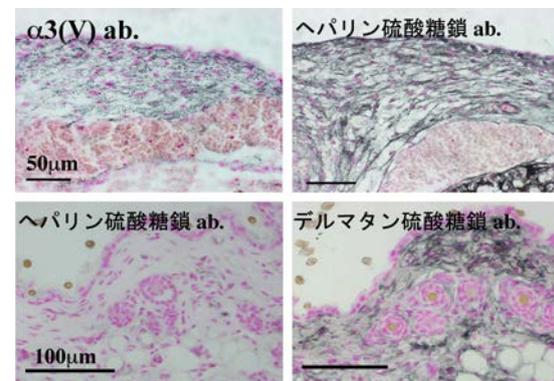


Fig. 6 臍帯と真皮のコラーゲン形態の比較。

臍帯には $\alpha 3(V)$ が特に多く含まれることが作製した抗体によって確認された。また同時にヘパリン硫酸糖鎖も多く含まれることも分かった。 $\alpha 3(V)$ の発現の見られない正常真皮には、ヘパリン硫酸鎖も殆ど検出できなかった。創傷によって、真皮でもヘパリン硫酸が $\alpha 3(V)$ の発現と共に観察される様になった。

②一方、同じグリコサミノグリカンであり、コラーゲン組織に一般的にみられるデルマタン硫酸鎖は $\alpha 3(V)$ の局在と関係なく、全てのコラーゲン組織に普遍的に見られた。(下段)他のコンドロイチン硫酸鎖も同様であった。

電子顕微鏡レベルの解析により、臍帯でも創傷部位と同様に、コラーゲン線維周囲に $\alpha 3(V)$ 鎖が絡み付くように局在すること、そしてヘパリン硫酸鎖と共局在することがより高頻度に観察された。臍帯でのコラーゲン線維は殆どが細い線維に留まり、線維の集束会合は強く抑制されており、柔軟な組織が維持されていた。これに対して真皮ではコラーゲン線維は急速に太い線維に成長した。少なく

ともデルマタン硫酸には集束抑制作用は観察されなかった。また、真皮のコラーゲン線維は付着物も観察されず、滑らかであった。

#### その他の実験結果

(5) 作製したpcDNA3ベース $\alpha 3(V)$ 強制発現ミニジーンをNIH3T3細胞に導入し、コラーゲンスポンジ上で培養を行った。しかしながら培養担体上へのコラーゲン蓄積は認められなかった。分泌されたコラーゲンは培地中に拡散するのみであり、コラーゲンを線維として蓄積させるには生体内の未知なシステムが必要であると考えられた。

$\alpha 3(V)$ のバイオアッセイを行う目的でマウスの胎盤と羊膜より、 $\alpha 3(V)$ を含むコラーゲンを抽出した。しかしながら確保できる量が少なかったため、*in vivo* 投与実験に用いるには出発材料等を含め検討が必要である。大腸菌由来の $\alpha 3(V)$ 蛋白を用いて初代線維芽細胞に対してのバイオアッセイを行ったところ、強い細胞接着活性、細胞伸展活性が確認された。細胞増殖には影響がなかった。コラーゲン体でない、大腸菌由来 $\alpha 3(V)$ をマウス個体創傷部へ投与したが、特別な効果は見られなかった。今後精製の検討も含めてネイティブな $\alpha 3(V)$ による試験が必要である。

#### 本研究課題の成果の総括

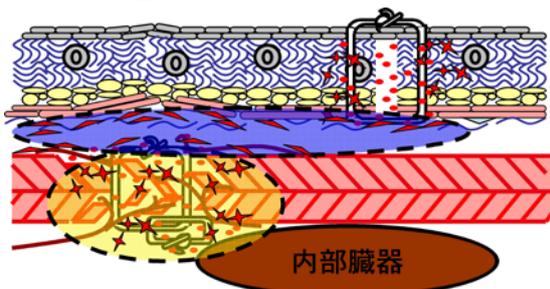


Fig. 7

(1) 希少なコラーゲン分子種 $\alpha 3(V)$ は主に皮膚創傷時に筋膜・皮下境界領域において一過背に発現し、癒着と過度の線維化を抑制する効果を確認した。

(2)  $\alpha 3(V)$ の発現細胞は筋膜由来の線維芽細胞（上図青色）であり、筋と皮膚の間に剥離面を形成させ癒着を防止した。

(3) 体腔内の創傷治癒に関与する線維芽細胞は由来が異なり $\alpha 3(V)$ を発現せず高頻度に癒着が生じた（上図黄色）。

(4)  $\alpha 3(V)$ の抗線維化の機序はコラーゲン主線維に取り込まれず、細かい線維片として、まとわり付くことにより、立体障害的に線維集束を抑制するモデルが考えられた。

(5)  $\alpha 3(V)$ の線維集束抑制効果に高分子量のヘパリン硫酸糖鎖分子の関与が考えられた。

(6)  $\alpha 3(V)$ は上皮細胞の基底膜直下にも多く発現し、強い細胞接着活性を持つため、上皮化を強く促進することが考えられ、これも抗癒着活性の機序の一つと考えられた。

(7)  $\alpha 3(V)$ は臍帯、羊膜に特に多く含まれ、将来的に臍帯血採取後の臍帯や、羊膜からこれを精製することにより、抗癒着性のバイオマテリアルを開発できる可能性が示唆された。

#### 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 10 件)

- ① Sumiyoshi H., Kitamura H., Matsuo N., Tatsukawa S., Ishikawa K., Okamoto O., Fujikura Y., Fujiwara S. and Yoshioka H., : Transient expression of mouse pro- $\alpha 3(V)$  collagen gene, (col5a3) in wound healing, *Connect. Tissue Res*, 査読有 in press
- ② Yano H., Hamanaka R., Nakamura M., Sumiyoshi H., Matsuo M. and Yoshioka H., : Smad, but not MAPK, pathway mediates the expression of Type I collagen in radiation induced fibrosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 418(3), 457-463, 2012, 査読有
- ③ Kusunoki M., Misumi J., Shimada T., Aoki K., Matsuo N., Sumiyoshi H., Yamaguchi T. and Yoshioka H., : Long-term administration of the fungus toxin, sterigmatocystin, induces intestinal metaplasia and increases the proliferative activity of PCNA, p53, and MDM2 in the gastric mucosa of aged Mongolian gerbils, *Environ Health Prev. Med.*, 16(4), 224-231, 2011, 査読有
- ④ Kato A., Okamoto O., Ishikawa K., Sumiyoshi H., Matsuo N., Yoshioka H., Nomizu M., Shimada T and Fujiwara S., : Dermopontin interacts with fibronectin,

promotes fibronectin fibril formation, and enhances cell adhesion, *J. Biol. Chem.*, 286(17), 14861-14869, 2011, 査読有

⑤ Ishikawa K., Sumiyoshi H., Matsuo N., Takeo N., Goto M., Okamoto O., Tatsukawa S., Kitamura H., Fujikura Y., Yoshioka H. and Fujiwara S. :Epiplakin accelerates the lateral organization of keratin filaments during wound healing, *J. Dermatol. Sci.*, 60 (2), 95-104, 2010, 査読有

⑥ Wu Y., Matsuo N., Sumiyoshi H. and Yoshioka H., :Sp7/Osterix is involved in the up-regulation of the mouse pro-alpha 1 (V) collagen gene (Col5a1) in osteoblastic cells, *Matrix Biology*, 29(8), 701-706 2010, 査読有

⑦ Wu Y., Matsuo N., Sumiyoshi H. and Yoshioka H., :Sp7/Osterix up-regulates the mouse Pro- $\alpha$ 3(V) collagen gene (col5a3) during the osteoblast differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 394(3), 503-508, 2010, 査読有

⑧ Hamada Y., Sumiyoshi H., Matsuo N., Wu Y. F., Nakashima M., Yanagisawa S. and Yoshioka H., :The pro- $\alpha$ 2(XI) collagen gene is expressed in odontoblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 392, 166-170, 2010, 査読有

⑨ Wu Y., Matsuo N., Sumiyoshi H. and Yoshioka H., :The Sp1 and CBF/NF-Y transcription factors cooperatively regulate the mouse Pro- $\alpha$ 3(V) collagen gene (col5a3) in osteoblastic cells, *Acta Med. Okayama*, 64(2), 95-108, 2010, 査読有

⑩ Okamoto O., Hozumi K., Katagiri F., Takahashi N., Sumiyoshi H., Matsuo N., Yoshioka H., Nomizu M. and Fujiwara S., :Dermatopontin promotes epidermal keratinocyte adhesion via  $\alpha$ 3/ $\beta$ 1 integrin and a proteoglycan receptor, *Biochemistry*, 49, 147-155, 2010, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 福光寛、東山礼一、中尾祥絵、皆川香織、茂呂 忠、三上健一郎、住吉秀明、山岡華児、東 清史、稲垣 豊、: 骨髓細胞由来の肝線維化改善・再生因子の同定と臨床応用、肝臓病

壁細胞研究会、2011年12月17-18日、東京ガーデンパレス (東京都)

② 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克、: 創傷治癒課程におけるV型コラーゲン $\alpha$ 3鎖の機能について、第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会、2010年12月7-10日、神戸ポートアイランド (兵庫県)

③ 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克、: 創傷治癒課程におけるV型コラーゲン $\alpha$ 3鎖の機能について、第42回日本結合組織学会・第57回マトリックス研究会、2010年8月19-20日、秋田拠点センター・アルヴェ (秋田県)

④ 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克、: The study of fibrogenesis using a wound healing model、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9-12日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑤ 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克、: The study of fibrogenesis using a wound healing model、第8回PPCTSS環太平洋結合組織国際学会第41回日本結合組織学会・第56回マトリックス研究会、2009年6月4-7日、湘南国際村 (神奈川県)

## 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

稲垣 豊 (INAGAKI YUTAKA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号 : 80193548(2011:研究分担者)

松尾 哲孝 (MATSUO NORITAKA)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10284788(2009~2010:研究分担者)

吉岡 秀克 (YOSHIOKA HIDEKATSU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号 : 00222430(2009~2010:研究分担者)

濱中 良志 (HAMANAKA RYOUJI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号 : 60274750(2009~2010:研究分担者)

岡本 修 (OKAMOTO OSAMU)

大分大学・医学部・講師

研究者番号 : 40284799(2009~2010:研究分担者)