

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300176

研究課題名(和文)再生医療用ナノファイバー構造体の多元制御と角膜再生への応用

研究課題名(英文) Multi dimensions control of a nanofiber structure for regenerative therapy and its application to cornea regeneration

## 研究代表者

小林 尚俊 (Kobayashi, Hisatoshi)

独立行政法人物質・材料研究機構・生体機能材料ユニット・グループリーダー

研究者番号：90354266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでに研究を行ったコラーゲン・シルクなどの素材を組み合わせることで、角膜の構造にきわめて類似した構造体構築のための基本技術の研究を行った。電界紡糸技術を用い、上皮基底膜類似ナノファイバー足場材料の開発、ナノファイバーの透明性を向上し実質再生への活用、高強度デスメ膜構造再生に関する基礎的なデータを得た。ファイバー材料の弱点である光の透過性は、ファイバーサイズをナノのレベルまで細くすること、ファイバー空間が細胞ニッチとなり、再生組織(コラーゲン等)で埋まることで著しい向上が認められた。上皮、実質細胞とも、繊維足場の構造、硬さ、表面などに影響を受けることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied basic technology for an extremely similar structure with corneal structure, by using collagen and silk materials which we have studied. Using electrospinning method, we developed epithelium basal membrane similar nanofiber scaffolding. And we tried to develop the transparency improved nanofiber. And we got fundamental data about high intensity Descemet's membrane structure regeneration. Turning fiber size down to a level of nano, and making the comfortable space between the nanofibers(cell Niche), the light scattering had been minimized, then the transparency was improved. Higher order structures, surface characters, and hardness of the fibers, were strongly affect to the responses of both corneal epithelium and Keratocyte.

研究分野：生体材料学

キーワード：角膜再生材料 ナノファイバー高次構造化 生体タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

日本国内では年間2万人以上の患者が、角膜移植の対象疾患で移植治療を待っているが、角膜移植が行われるのは年間1600人程度である。世界的には、角膜の障害による失明は、少なくとも10万人以上は存在すると推定されている。この現状は、移植用角膜の不足が主要因であり、失明患者の救済、失明患者のために費やす社会保障費用削減などの観点から角膜実質代替材料の開発が強く望まれている。また、現状でも輸入角膜が約半数で使用されており、我が国発での代替技術開発が必要不可欠である。移植用角膜の代替材料の研究として、透明な高分子系材料を用いた人工角膜の開発と再生医科学の側面からの角膜再生の研究がこれまでなされてきた。人工角膜の開発においては、提案者も一定の成果を挙げてきたが、長期安定に機能する材料開発には未だ到っていないのが現実である(参考文献: 1. *Materials Science & Engineering, C*, 24, 729-735(2004)、2. *J. Biomed. Mater. Res. B, Appl. Biomater.*, 56-63(2006))。再生医療からの取り組みでは、角膜上皮、角膜内皮再生の試みは臨床応用にまで到達し、大きな成果が得られている(参考文献: Nishida et.al, *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* 351 (12): 1187-1196(2004)。また、カナダの May Griffith らのグループにより、リコンビナントのコラーゲンの架橋体に関する Phase 1 臨床データが公表され(P Fagerholm, et.al, *Science Translational Medicine* 2(46), 1-8(2010))、10人中6人で2年後に視力回復が認められたという報告がなされ、今まで手付かずであった角膜のほぼ90%を占める実質部分の再生に関しても積極的な検討が開始されている。しかしながら Griffith らの材料も、強度が不足しているため実質の一部分置換が行われただけで全層角膜移植の適応とは成っていない。我々も、角膜実質部の再生の試みとして、豚角膜の脱細胞化処理による角膜代替材料としての検討を行い1年にわたり透明で組織反応の軽微な実質材料の開発に成功している(Hashimoto, et.al, *Biomaterials*, 31(14), 3941-3948(2010), Sasaki, et.al, *Molecular Vision*, 15, 2022-2028(2009))。しかしながら、我々の研究においても脱細胞化処理により組織強度が低下し、未だ全層角膜移植の代替と成り得る材料の提供には至っていない。角膜にはその強度を担うデスメ膜という構造があり、眼圧に長期さらされても眼球の変形をおこさない強度をもっている。十分な強度を有し、全層角膜移植に使用可能な再生角膜を創成するには、デスメ膜構造をも再生する技術開発を行なう必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに研究を行った素材及び新規素材を組み合わせることで、角膜の構造にきわめて類似した構造体構築のための

基本技術開発に関する研究を行う。具体的には、上皮再生:既存シート技術活用及び合成・天然由来高分子の電界紡糸技術を用いた上皮基底膜(ボウマン膜)類似ナノファイバー足場材料の開発、実質再生:ナノファイバーからのボトムアップ構築法の研究、デスメ膜構造再生:ナノファイバースポンジ内への活性化ケラトサイトの播種及び長期培養によるコラーゲン産生の促進と配向制御による高強度組織体構築、を新たに試み、内皮の基底膜及び眼圧に耐える高強度構造組織の構築に関する研究を行うことで、全層移植に耐えうる再生角膜類構造体構築に関する研究を行う。

### 3. 研究の方法

全層角膜に対応できるように上皮再生、実質再生の研究の要素技術を集積化組織化できるよう改良を進めるとともに、本研究の基盤技術であるデスメ膜類似組織再生技術を作り上げるためのナノマイクロ足場材料の開発を中心に行った。足場材料としての評価を行う過程でコラーゲン産生、足場構造解析を行った。

3-1. 角膜上皮基底膜足場材料の構築:エレクトロスピンニングによるナノファイバー作成技術等を活用してナノファイバーからなるシート状生成物を作成した。これらの試作材料に対して角膜上皮の接着増殖などを行い、これを指標に一次選定を行った。コラーゲンを固定化したPVAナノファイバー、シルクフィブロインナノファイバー、キトサンナノファイバー、コラーゲンナノファイバーなどの試作を行った。続いて、人由来角膜上皮細胞を用いて作製した不織布上で培養実験を行った。

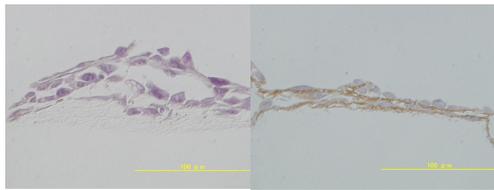
3-2. デスメ膜様構造再生のためのナノファイバーのマイクロ構造制御材料の構築:初期段階で細胞に局所的に多量のコラーゲンを産生させた後に、力学的環境下で長期の自己組織化を行うことで、コラーゲン量がリッチで力学負荷に耐える組織体の構築を検討するための、培養条件などの検討を進めた。とくに3-1で一次選定した、シルクフィブロインファイバーを中心に、角膜実質細胞の培養条件を検討した。

3-3. 実質再生:合成高分子、コラーゲン・シルク等のナノ短繊維を合成し、これの材料と角膜実質細胞との培養を行い自己組織化による角膜類似配向構造体の形成の可能性を検討した。これらと並行して、シルクフィブロインファイバーの配向性を制御して無配向ファイバーシートと配向ファイバーシートに関する実質細胞培養比較実験を行った。また、デバイスとしての形状制御、透明性の向上に取り組んだ。

3-4. 動物へのインプラント:角膜組織適合性を評価するために家兎角膜内に鏡視下インプラントベッドを作製し、短期-長期埋入試験を行い、その後組織学的な検討を行った。

#### 4. 研究成果

4-1. 角膜上皮基底膜足場材料の構築に関しては、絹、コラーゲンなどを原材料としてエレクトロスピンニングによるナノファイバーが良好な接着性と増殖性を示した。配向性を持たせ作製した試料と無配向の試料を比較すると無配向構造の試料上で角膜上皮の接着、増殖が良好に起こることが確認された。また、角膜上皮の接着増殖に関しては、ナノファイバーの配向構造のみならず、与えるテンションにより大きな差が生じることが判明した。角膜上皮の基底膜として無配向構造のシルクフィブロインサンプルにテンションをかけた状態で培養を行う系が推奨された。(図1)



HE染色:多層上皮化 ラミニン5:基底膜  
図1 シルクナノファイバー上での人角膜上皮(7日間培養)

角膜上皮を単独で播種した場合はナノ繊維の間隙に上皮の潜り込みが観察され、角膜上皮のバリア性を考慮すると最適な構造とはならなかった。そこで、配向絹フィブロインナノファイバーフィルムの裏側にあらかじめ角膜実質細胞を播種し、2週間培養を継続し、その後、上皮の播種を行いその状況を組織学的に検討を行った結果、ファイバー内への上皮の落ち込み現象が軽減され、最外層に上皮層の形成が認められた。免疫染色の手法を用いて、細胞の状態を検討した結果、角膜上皮は、増殖の指標であるPCNA (proliferating cell nuclear antigen) 陽性細胞が多数観察されたのに対して、実質細胞は陰性となり、正常な角膜上で起こっている鎮静化した実質の上で角膜上皮がターンオーバーしている状況に類似した構造組織体の形成が起きていることを伺わせる所見を得た。また、角膜上皮では基底膜成分であるコラーゲンタイプ7およびラミニンの産生が確認され(図2)、実質細胞

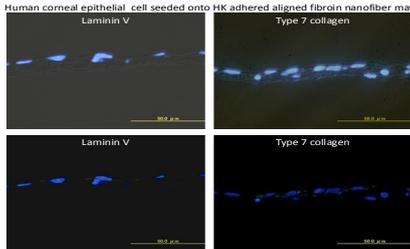


図2 シルクナノファイバー不織布を担体とした人角膜上皮-実質細胞の共培養(14日間培養)

では、ビメンチン陽性、SMA- $\alpha$ 陰性、プロコラーゲン実質細胞とも良好な分化状態をとることが示された。

4-2. デスメ膜様構造再生のためのナノファイバーのマイクロ構造制御材料の構築に関しては、初期的に足場となるナノファイバーに対して張力を加えた系と加えない系において家兎角膜実質細胞を用いて検討を加えた結果、足場としての硬さが増すようにナノファイバー不織布に張力を加えた系でより良い細胞接着、増殖、分化が起こることが示唆される予備的結果を得た。この結果を踏まえて、配向ナノファイバー不織布に対して人角膜実質細胞を播種し培養を行い、コラーゲンの産生の有無に関してPCPE(Procollagen C-proteinase enhancer-1)を免疫染色法を用いて染色し、これを指標として評価した。(図3)この結果



HE染色 PCPE免疫染色  
図3 シルクナノファイバー配向不織布を担体とした人角膜実質細胞の培養とコラーゲン産生能(7日間培養)

配向したシルクナノファイバー不織布内には実質細胞が生着増殖し、1週間という早期においても活発にコラーゲンを産生する方向で角膜実質細胞が維持されることが判明した。また、材料強度を増すため製造プロセスを再検討した結果、液体浴に対して紡糸を行う手法を取り入れることで、透明性を向上し、かつ、これまでより強度のあるフィブロインナノファイバー構造体の作製法を考案することができた。

4-3. 実質再生に関しては、フィブロイン等のナノ繊維化を行い、さらに切断機、ホモジナイザーなどを用いた短繊維合成に着手した。短繊維化には成功しているが、収率などの問題を解決する必要がある。続いて、全層角膜類似構造体の構築に向けた準備として、レンズ形状を持つサンプルを作製するツールの設計と作製を行い、プロトタイプを試作を行った。(図4)レンズの金属製雄型を作製しこれ

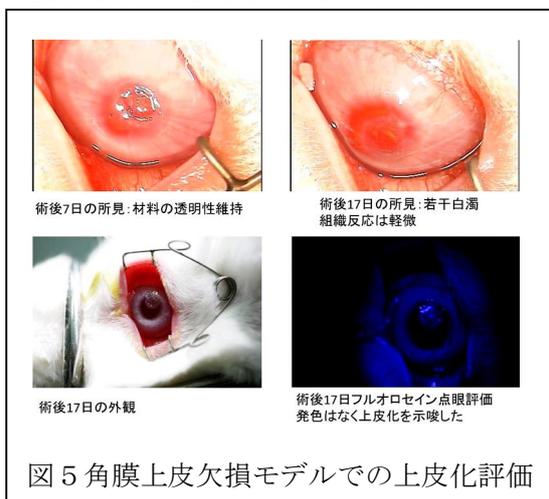


図4 レンズ状ナノファイバー不織布の試作

を電界紡糸のプロセス中にコレクター側に設置し、雄型をアースに接続するとレンズ形状を写し取ることができた。また、フィブロインナノファイバーの細線化と配向性を向上させるとともに、ファイバー形状を失わない程度にナノファイバーの部分的な溶解処理を行うことで材料の透明性向上が認められた。また、これらの間隙にコラーゲンを充填することで、フィブロインナノファイバーとファイバーに生ずる屈折率の違いを解消することで界面における光の乱反射が抑えられ、更なる透明性の向上が認められた。

4-4. 動物へのインプラントに関しては、短期中期に関して観察を行い、良好な成績を得たので、最終的にフィブロインナノファイバーに絞って、長期安全性試験のために2羽の家兎を用いて1年間の埋植試験を行った。埋植したサンプルは、初期的には可視光の透過性が80%程度と不透明な材料であったが、1羽においては術後3カ月程度で、もう1羽に関しては3週間という超早期に埋植したサンプルの確認が難しいほど透明性が増した。この結果は、初期に透明性が不十分な繊維材料でも、埋入部位における繊維材料の再配列や実質細胞から分泌されるコラーゲン等のタンパク生体成分が繊維間隙に充填されるなどの要件を満たせば、埋入後に透明化が起こることを示した。このメカニズムに関しては、一部組織学的検討を行った結果から傍証を得ているが、更なる検討が必要である。

また、より臨床応用に近いモデルとして角膜上皮欠損モデルを用いてIn vivoにでの上皮化の検討を行った。(図5) その結果、17日まで



には、In vivoにおいても材料上に上皮層が形成されることが確認された。

全層角膜移植への対応に関しては、強度的にまだまだに不十分であり、更なる検討が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7件)

1. 服部晋也、小林尚俊、シルクフィブロインナノ繊維集合体の角膜再生足場とし

ての有用性、SEN-I GAKKAISHI、査読有、Vol. 71、No. 3、2015、pp. 117-122

2. 服部晋也、小林尚俊、角膜再生材料、工業材料、査読無、Vol. 63、No. 2、2015、pp. 45-50
3. 服部晋也、寺田堂彦、本田貴子、寺本英敏、亀田恒徳、玉田靖、小林尚俊、人工角膜材料としてのフィブロインファイバー不織布の有用性、日本シルク学会誌、査読有、Vol. 22、2014、pp. 117-123
4. 寺田堂彦、服部晋也、小林尚俊、シルクナノファイバーからなる角膜再生材料の開発、化学工業、査読無、Vol. 63、No. 7、2012、pp. 59~66

[学会発表] (計 30件)

1. 小林尚俊、New material concept for corneal regeneration、Sweden-Japan seminar on Nanomaterials and Nanotechnology、2015/03/10、Linkoping (Sweden)
2. 小林尚俊、Mid to long term compatibility evaluation of fibroin scaffold in rabbit cornea、TERMIS-AM2014、2014/12/15、Washington D. C. (USA)
3. 小林尚俊、Biodegradable shortened electrospun nanofibers scaffold for big size Spheroid formation、TERMIS-AM2014、2014/12/14、Washington D. C. (USA)
4. 小林尚俊、Development of novel artificial cornea from silk fibroin、23rd congress on sericulture and silk industry、2014/11/26、Bangalore (India)
5. 服部晋也、角膜実質再生材料を目指した透明フィブロインナノファイバー不織布の開発、第36回日本バイオマテリアル学会大会、2014/11/18、タワーホール船堀 (東京都)
6. 服部晋也、人工角膜としてのフィブロインナノファイバー不織布の角膜内長期移植評価、第36回日本バイオマテリアル学会大会、2014/11/17、タワーホール船堀 (東京都)
7. 服部晋也、絹フィブロインナノファイバー不織布の透明化、第63回高分子討論会、2014/09/25、長崎大学文教キャンパス (長崎県・長崎市)
8. 小林尚俊、Nano fibrous materials for tissue engineering applications、Advanced Materials World Congress 2013、2013/09/18、Çeşme (Turkey)
9. 服部晋也、Evaluation of the fibroin nanofiber nonwoven mat as an artificial corneal stroma、Advanced Materials World Congress 2013、2013/09/17、Çeşme (Turkey)
10. 小林尚俊、Nano fibrous materials for tissue engineering applications、

EUROMAT 2013、2013/09/12、Sevilla (Spain)

11. 小林尚俊、Influence of insolubilizing process of silk fibroin to the cell、ESB-2013、2013/09/09、Madrid (Spain)
12. 小林尚俊、Fibroin Fiber For Artificial Corneal Stroma、TERMIS-EU、2013/06/18、Istanbul (Turkey)
13. 小林尚俊、絹フィブロインの不溶化処理条件の違いによる細胞接着挙動の変化に関する検討、第62回高分子学会年次大会、2013/05/30、京都国際会館(京都府)
14. 服部晋也、人工角膜としてのフィブロインファイバー不織布の生体内評価、第62回高分子学会年次大会、2013/05/30、京都国際会館(京都府)
15. 小林尚俊、角膜再生治療の現状と展望、NIAS シンポジウム第7回「フィブロイン・セリシンの利用」研究会、2013/02/21、秋葉原コンベンションホール5階(東京都)
16. 服部晋也、絹たんぱく質由来材料からなる人工角膜実質開発の試み、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、2012/11/26、仙台国際センター(宮城県・仙台市)
17. 小林尚俊、Nano fibrous materials for tissue engineering scaffolds、International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials、2012/10/22、Brisbane (Australia)
18. 小林尚俊、機能化再生医療用ナノファイバーの創製、平成24年度繊維学会秋季研究発表会、2012/09/25、福井大学(福井県・福井市)
19. 小林尚俊、Fabrication of novel artificial corneal substitute using silk protein derived materials、3rd TERMIS World Congress、2012/09/06、Vienna (Austria)
20. 服部晋也、Time Laps Study on the Interaction between a Single-nanofiber and Cells、9th World Biomaterials Congress、2012/06/05、Chengdu (China)
21. 寺田堂彦、Silk fibroin nanofibers as a regenerative scaffold of a cornea、9th World Biomaterials Congress、2012/06/03、Chengdu (China)
22. 服部晋也、Evaluations of the biocompatibilities of sterilized silk-protein derived material as a novel artificial corneal stroma、9th World Biomaterials Congress、2012/06/03、Chengdu (China)

[図書] (計 5件)

- ① 小林尚俊、Springer-Verlag Berlin Heidelberg、"Polymeric Nanomaterials

for Ophthalmology" ENCYCLOPEDIA OF POLYMERIC NANOMATERIALS、2014、1-6

- ② Yashpal Sharma、Ashutosh Tiwari、小林尚俊、WILEY-Scrivener Publishing、"Electrospun Nanofiber for Three Dimensional Cell Culture" Nanomaterials in Drug Delivery Imaging and Tissue Engineering、2013、425-441

[産業財産権]

○出願状況 (計 2件)

名称：透明フィブロインナノファイバー不織布、細胞培養用基材、細胞シート及び透明フィブロインナノファイバー不織布の製造方法

発明者：小林尚俊、服部晋也、亀田恒徳  
権利者：国立研究開発法人物質・材料研究機構、国立研究開発法人農業生物資源研究所  
種類：特許権

番号：特許願 2014-177280 号

出願年月日：平成26年9月1日

国内外の別：国内

名称：細胞培養用支持体の製造方法、細胞培養用支持体および細胞培養方法

発明者：小林尚俊、寺田堂彦、玉田靖  
権利者：国立研究開発法人物質・材料研究機構、国立研究開発法人農業生物資源研究所  
種類：特許権

番号：特許願 2013-101259 号、特許開 2014-221011 号

出願年月日：平成25年5月13日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

[http://samurai.nims.go.jp/KOBAYASHI\\_Hisatoshi-j.html](http://samurai.nims.go.jp/KOBAYASHI_Hisatoshi-j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林尚俊 (KOBAYASHI, Hisatoshi)  
物質・研究機構 生体機能材料ユニット  
・グループリーダー

研究者番号：90354266

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

服部晋也 (HATTORI, Shinya)  
物質・研究機構 生体機能材料ユニット  
・ポスドク研究員

研究者番号：30469762