

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17014

研究課題名(和文) LTBP-4タンパクフラグメントを用いた弾性線維含有基質再生の基礎的研究

研究課題名(英文) Experimental research of elastic fiber regeneration accelerated by fragment protein of latent TGF-beta binding protein 4.

研究代表者

綾 梨乃 (Aya, Rino)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90469643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：弾性線維再生促進作用が報告されているlatent TGF-binding protein 4(LTBP-4)のフラグメント蛋白を作成し、弾性線維形成促進作用について検討したが、弾性線維の形成を促進することが可能なフラグメントの特定には至らなかった。これと並行して弾性線維の再生を促進する新規基材の開発を行った。この基材はLTBP-4リコンビナント蛋白を複合化したコラーゲンスポンジであり、一定期間保存が可能である。この基材にてヒト皮膚由来の線維芽細胞を培養することにより弾性線維の形成が促進されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

弾性線維は細胞外基質の構成成分であり、組織の弾性を担っているが、加齢などにより一旦障害されると生体内で再構築されない。弾性線維の再生は困難とされてきたが、われわれはこれまでに弾性線維の再生が可能なコラーゲンスポンジを作成し、報告している。今回、この基材に弾性線維再生促進作用が報告されているタンパク、LTBP-4を複合化することにより弾性線維の形成促進作用が確認された。このLTBP-4複合化基材はスポンジの形状で常温にて一定期間保存可能であり、臨床応用に近づいたといえる。

研究成果の概要(英文)：I couldn't reach to identification of fragment protein of latent TGF-binding protein 4 (LTBP-4) which accelerated elastic fiber regeneration. Simultaneously, I developed new substrate material that could accelerate elastic fiber regeneration. This material was the collagen sponge compounded with recombinant LTBP-4 and could be stored for a fixed period. When This material was seeded with human dermal fibroblasts and cultured, accelerated elastic fiber accumulation was seen within the material. I determined appropriate concentration of recombinant LTBP-4 to be compounded.

研究分野：弾性線維の再生

キーワード：弾性線維 LTBP-4 コラーゲンスポンジ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

弾性線維は肺や動脈、皮膚などの細胞外基質に存在し組織の弾性を担うが、老化とともに劣化、減少し、肺気腫や動脈硬化、皮膚のたるみなどの加齢性変化を引き起こす。また、瘢痕やケロイドにおいても欠如しており、硬く伸展に乏しい組織となり運動障害を引き起こすこともある。このように生体内においては一度障害された弾性線維を十分に再生させることはできない。

また、これまで実験系においても臨床応用可能な弾性線維の再生は困難であった。このため、弾性線維の減少に起因する上記病態に対する根本的な治療は不可能であった。申請者は弾性線維誘導タンパクである latent TGF- β binding protein 4 (LTBP-4)の応用により、in vitro 実験および短期移植モデルにおいて弾性線維の三次元的再生を実現した。この技術を用い、臨床応用可能な弾性線維の再生を実現すべく研究を行っていた。

引用文献

Aya, Noda, Nakamura, Naitoh, Suzuki, et al. Regeneration of elastic fibers by three-dimensional culture on a collagen scaffold and the addition of latent TGF- β binding protein 4 to improve elastic matrix deposition. *Biomaterials*, 2015

2. 研究の目的

LTBP-4 は分子量が 200kDa と比較的大きいタンパク質であるため、臨床応用に適する条件で精製することに技術的改良が必要であることと、抗原性の問題がある。弾性線維が形成される際に LTBP-4 が fibulin-5 と結合するが、これに関与するのは LTBP-4 の N 末端フラグメントであることが証明されている。また、マイクロフィブリルへの結合には LTBP-4 の C 末端フラグメントが必要であることが分かっている。このような部位を含む短いフラグメントのみで弾性線維再生促進作用を得られれば、前述の精製や抗原性などの諸問題を解決でき、臨床応用可能な弾性線維再生促進剤の作製ができると着想した。

以上より、本研究では弾性線維再生能を持つ LTBP-4 フラグメントの探索とその最短化を行うことを目的とした。

引用文献

Noda, Suzuki, Nakamura, et al. Latent TGF- β binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013

3. 研究の方法

(1)部分フラグメントの発現ベクターを 293T 細胞に導入して LTBP-4 の N 末 + C 末のフラグメントタンパクを精製した。インフォームドコンセントを行った上で同意を得て採取した、ヒト皮膚由来の線維芽細胞の平面培養において、全長の LTBP-4 リコンビナントタンパクをポジティブコントロールとして培地に添加する群と、上記のフラグメントタンパクを添加する群およびタンパクを添加しない群に分け、2 週間培養を行った後に凍結切片を作成して免疫組織学的染色を行い、弾性線維の形成状況を確認した。

(2)上記検討と並行して、LTBP-4 を複合化した基材を作成し弾性線維形成促進作用について検討した。この複合化基材の作成方法は、以下の通りである。使用したコラーゲンスポンジは、すでに臨床応用されている人工真皮(ペルナック®)のコラーゲンの架橋条件およびスポンジ孔径を変えることで、これまでにわれわれが報告した、線維芽細胞の 3 次元培養によって弾性線維の形成が可能なものである。このコラーゲンスポンジにリコンビナント LTBP-4 を含浸して再凍結乾燥し、LTBP-4 複合化基材を作成した。このとき複合化する LTBP-4 の濃度を先行の論文より算出し、それぞれ 0, 0.1, 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ とした。この基材においてヒト皮膚由来の線維芽細胞を 3 週間培養した後に凍結切片を作成して免疫組織学的染色を行い、弾性線維の形成状況を確認した。

4. 研究成果

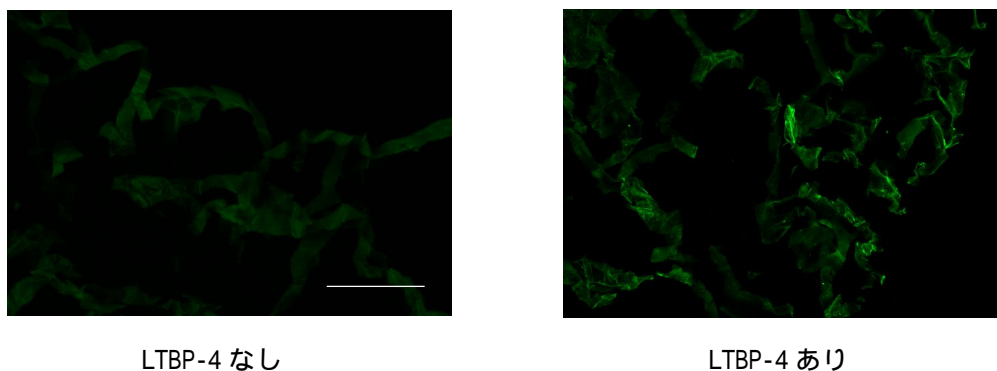
(1)LTBP-4 タンパクフラグメントの検討

まず、凍結保存した LTBP-4 フラグメントタンパクを用いて検討を行ったが、弾性線維再生促進作用が認められなかった。この結果を受けて、凍結段階においてタンパクが失活した可能性を考え、凍結保存しない精製直後のタンパクフラグメントについても検討を行ったが、これについても弾性線維再生促進作用は認められなかった。

(2)LTBP-4 複合化基材の検討

検討に先立って、作成した LTBP-4 複合化基材において、コラーゲンスポンジの性状が維持されていることと、スポンジに LTBP-4 が沈着していることを確認した(図 2)。

図2 基材へのLTBP-4の局在(抗FLAG抗体による免疫染色) Bar=100 μm



まず、複合化するLTBP-4の濃度を0, 0.1, 1, 10 μg/cm²として、この新規基材において、ヒト皮膚由来の線維芽細胞の3次元培養を行った。この結果、0.1 μg/cm²では弾性線維形成促進作用が認められなかったが、1, 10 μg/cm²にて弾性線維形成促進作用を認めた。(図1)。

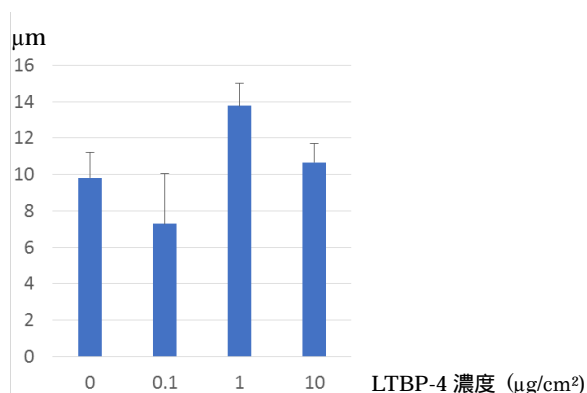


図1 LTBP-4 複合化基材において形成された弾性線維の厚み

そこで、0, 1, 5 μg/cm²のLTBP-4を複合化した基材を用いてヒト皮膚由来の線維芽細胞の培養を行い、弾性線維の形成状況を確認した。複合化するLTBP-4は5 μg/cm²でもっとも弾性線維の形成が多く認められ、LTBP-4を複合化しないものと比較して、形成された弾性線維の厚みが1.5-2倍であった。ただし、作成して12か月経過した基材にて行った実験では弾性線維形成促進作用が認められなかった。基材を作成して5か月までに使用したものでは弾性線維形成促進作用が認められており、本複合化基材が活性を維持する期間については追加で検討を要するものと思われた。

また、ここで形成された弾性線維を3次元的に評価する方法として2光子顕微鏡を用いた観察を行った。これにより形成された弾性線維を3次元的に描出することに成功した。

本検討において作成した基材は常温で一定期間保存可能であり、弾性線維再生促進の活性を維持する。これまで実験系で使用してきたLTBP-4は凍結保存が必要であったが、基材に組み込ませて一定期間保存可能であるこの複合化基材は、臨床応用しやすく、これまでより弾性線維再生の実用化により近付いたといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

LTBP-4 複合化基材における線維芽細胞の培養で弾性線維の再生が促進される
 綾 梨乃、野田 和男、中邨 智之、平 嗣良、坂元 悠紀、鈴木 茂彦
 第26回日本形成外科学会基礎学術集会 2017年

弾性線維再生の実用化を目指して
綾 梨乃、野田 和男、内藤 素子、坂元 悠紀、平 嗣良、中邨 智之、鈴木 茂彦
第 47 回日本創傷治癒学会 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：弾性線維組織再生基材及び弾性線維組織再生基材の製造方法

発明者：京都大学 / 関西医科大学 / グンゼ

権利者：：京都大学 / 関西医科大学 / グンゼ

種類：特許

番号：特願 2017-170397

出願年：2017 年

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。