

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23249078

研究課題名(和文) 平面培養の時間的三次元化と機能性高分子複合化技術による弾性線維再生医療の実用化

研究課題名(英文) Investigation of a novel technique for regeneration of elastic fibers with three-dimensional culture on a collagen sponge scaffold and the addition of latent TGF-beta binding protein 4

研究代表者

鈴木 茂彦 (Suzuki, Shigehiko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30187728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 24,000,000円

研究成果の概要(和文)：平均孔径 $25\mu\text{m}$ , 120℃熱架橋処理したコラーゲンスポンジ(直径8mmの円形)を基材とし、ヒト皮膚由来の線維芽細胞を1000000個播種する培養条件下において、 $5\mu\text{g/ml}$ のLTBP-4は、弾性線維再生を促進した。LTBP-4の投与は、初期に1回でも弾性線維再生に有効である可能性が示唆された。LTBP-4の弾性線維誘導効果は、in vivoにおいても示された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to investigate the effects of latent TGF-binding protein 4 (LTBP-4) on elastic fiber regeneration in three-dimensional cultures of human dermal fibroblasts (HDFs). Collagen sponges cross-linked at 120 °C and composed of small pores (25  $\mu\text{m}$  on average) was favorable for elastic fiber regeneration by HDFs. Addition of LTBP-4, followed by culture for 21 days, accelerated elastic fiber accumulation within the scaffolds. Conditioned scaffolds containing either HDFs or LTBP-4-built mature elastic fibers were implanted between the dermis and the cutaneous muscle of mice. The combined use of HDFs and LTBP-4 resulted in thicker tissues containing elastic fibers. These results indicate that weakly cross-linked collagen sponges can be used as scaffolds for regenerating elastic fibers both in vitro and in vivo, and that the addition of LTBP-4 accelerates the deposition of both elastin and fibrillin-1, and increases cell proliferation.

研究分野：再生医療

キーワード：人工皮膚

1. 研究開始当初の背景

弾性線維は皮膚や血管、肺などに存在し、組織の柔軟性や可塑性に寄与するが、老化や癒痕形成にともない障害される。癒痕やケロイドでは弾性線維が形成されない(Ikeda, Naitoh, Suzuki et al, Biochem Biophys Res Commun, 2009)ため、硬く伸縮性に乏しい真皮組織となり、運動制限や成長障害など重大な機能障害を生じうる。このように、弾性線維は一旦障害を受けると十分な再構築は不可能であり、組織の伸縮性は失われ、硬い組織となる。これまで弾性線維の再生は困難とされ、熱傷、外傷、慢性潰瘍などの皮膚潰瘍に対し、保存的治療や自家植皮、あるいは人工真皮を用いた二次植皮などによる再建が行っても、単なる癒痕組織が形成されるにすぎず、真皮マトリクスの完全な再生はおこらないことが問題であった。

2. 研究の目的

前述した問題点を解決すべく、弾性線維再生に有用な人工基材の開発と、それを用いた弾性線維の再生。

3. 研究の方法

これまで弾性線維の再生は困難とされてきたが、我々は線維芽細胞単層培養においてLTBP-4 (latent TGF- $\beta$  binding protein 4) が弾性線維再生を誘導することを見いだした (Noda K, and Nakamura T et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 110(8):2852-7, 2013)。今回、小孔径 (平均孔径 25 $\mu$ m) のコラーゲンスポンジを基材とした線維芽細胞三次元培養系において、LTBP-4 を添加することによる、弾性線維再生促進作用について検討を行った。

培養基材 (直径 8mm の円形コラーゲンスポンジ) の条件検討:

- ①平均孔径 25 $\mu$ m、熱架橋 110 $^{\circ}$ C、120 $^{\circ}$ C、140 $^{\circ}$ C 処理
- ②平均孔径 100 $\mu$ m、140 $^{\circ}$ C熱架橋処理、
- ③平均孔径 100 $\mu$ m、140 $^{\circ}$ C熱架橋+グルタルアルデヒド処理

これらの基材に、それぞれヒト皮膚由来の線維芽細胞を 1000000 個播種、培養し、21 日後にサンプリングした。(図 1)

培養液: D-MEM/F12 (10%FBS 添加) にリコンビナントヒト LTBP-4 (Flag-tag) を添加する群 (5 $\mu$ g/ml) と添加しない群に分け、1 週間ごとに培地交換して培養した。

弾性線維再生の評価: 培養開始後 7 日、14 日、21 日でサンプリングし、抗 Elastin, 抗 Fibrillin-1, 抗 LTBP-4 抗体と 2 次抗体として Alexa Fluor 488, 546 を用いて免疫組織化学的染色を行った (n=3)。核染色には Hoechst 33258 を用いた。(図 2)

添加したリコンビナント LTBP-4 の局在調査には、抗 Flag 抗体を用いた。

染色像は、共焦点レーザー顕微鏡 (C1si confocal microscope, Nikon, Tokyo, Japan) で撮影し、Elastin と LTBP-4 の共局在部分

の面積を Imaging software NIS-Elements D3.00 を使用して計測、定量化し、400 倍視野 (n=5) あたりの数値として示した。(図 3) In vivo 移植実験:

平均孔径 25 $\mu$ m、熱架橋 120 $^{\circ}$ C のスポンジに以下の 4 条件で細胞を播種 (各 N=3)、4 時間培養後 5 W 雄のヌードマウスの肉様膜上に移植した。① スポンジのみ、②1000000 個線維芽細胞のみ、③スポンジ+LTBP4, ④1000000 個線維芽細胞播種+LTBP4。3 週後にサンプリングし 4%パラフォルムアルデヒド固定後、Elastica van Gieson (EVG) 染色を実施、染色面積を Imaging software : NIS-Elements D3.00 にて数値化、観察を行なった。

4. 研究成果

平均孔径 25 $\mu$ m、120 $^{\circ}$ C熱架橋処理したコラーゲンスポンジ(直径 8mm の円形)を基材とし、ヒト皮膚由来の線維芽細胞を 1000000 個播種する培養条件下において、5 $\mu$ g/ml の LTBP-4 は、弾性線維再生を促進することを見いだした。LTBP-4 の投与は、初期に 1 回でも弾性線維再生に有効である可能性が示唆された。LTBP-4 の弾性線維誘導効果は、in vivo においても示された。弾性線維再生の初期段階で microfibril が形成される時期に、LTBP-4 を投与することにより、Elastin-Fibulin5 complex が早期に、効率よく microfibril 上にリクルートされ、弾性線維再生が促進された可能性が示唆された。今後は、LTBP-4 の弾性線維再生に有効な機能的ドメインを同定し、より短い、分子量の小さいリコンビナント LTBP-4 の開発を目指す。以下に図を示す。

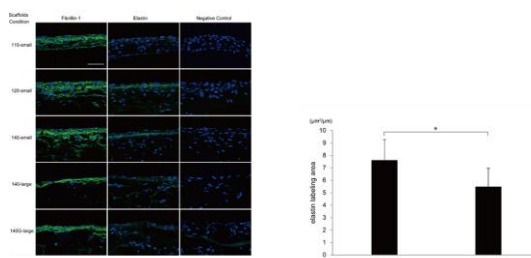
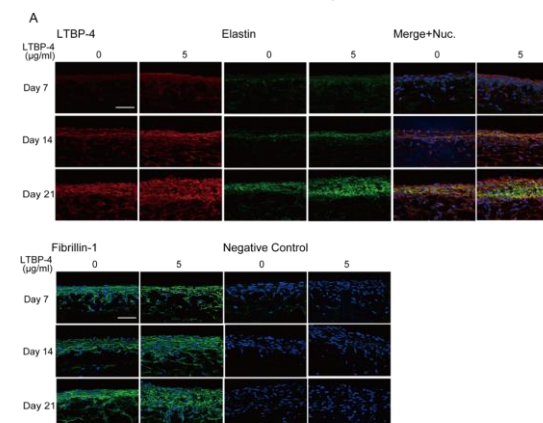
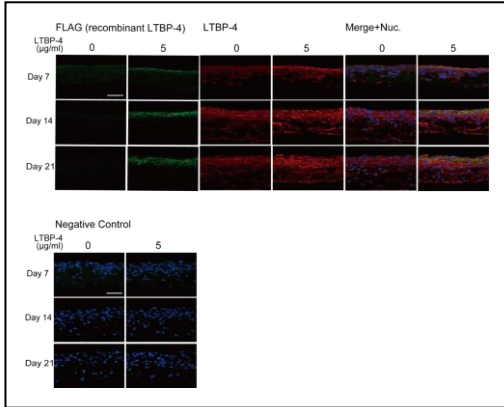


図 1. 培養基材 (コラーゲンスポンジ) の条件検討平均孔径 25 $\mu$ m,120 $^{\circ}$ C熱架橋処理したコラーゲンスポンジにおいて、弾性線維の形成が良好であったため、以下、このスポンジを用いて実験を進めた。



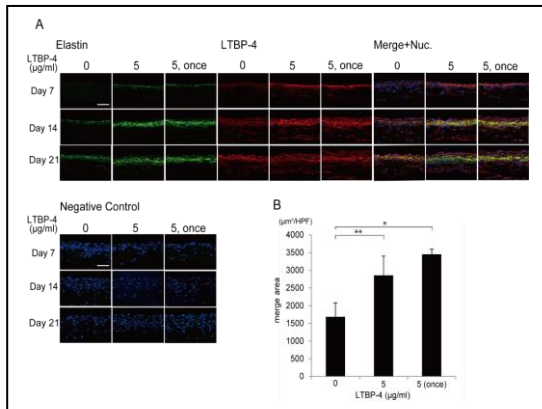
**図 2. LTBP-4 添加群と非添加群における三次元培養下弾性線維形成**

図 2 において、LTBP-4 添加群の方が、時間経過とともに非添加群と比較し、弾性線維主成分である Elastin と Fibrillin-1 の沈着が増加し、培養 21 日後の Elastin と LTBP-4 が共局在する部分も平均約 2.5 倍増加している。



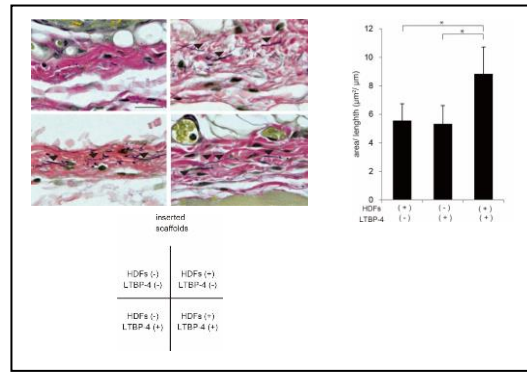
**図 3. 添加したリコンビナント LTBP-4 (FLAG-tag) と沈着した LTBP-4 の免疫染色**

添加したリコンビナント LTBP-4 (FLAG-tag) の局在を調べるため、抗 FLAG 抗体による免疫組織学的染色を行い、抗 LTBP-4 抗体による染色と merge させた。添加したリコンビナント LTBP-4 (FLAG-tag) の沈着は、培養日数が経過してもあまり増加せず、基材表面に限局している。LTBP-4 全体の沈着量は、培養日数の経過とともに増加し、基材内の深部まで沈着が進んでいる。



**図 4. リコンビナント LTBP-4 の 1 回投与群と、毎週投与群との比較：**

培養 21 日後の Elastin と LTBP-4 共局在部分 (弾性線維再生) の面積は、LTBP4 非添加群と比較し、LTBP-4 の 1 回投与群、毎週投与群のいずれにおいても有意に大きかった。Elastin と LTBP-4 共局在部分の面積は、LTBP4-1 回投与群と毎週投与群との間では有意差がなかった。LTBP-4 の初期 1 回投与で、弾性線維再生を促進する可能性が示唆された。



**図 5. in vivo における弾性線維再生の検証** in vivo においてスポンジのみの群と比較し、リコンビナント LTBP-4, 5µg/ml のみ、線維芽細胞のみの群でも弾性線維の再生が認められた。線維芽細胞と LTBP-4 の両方を含む群が最も弾性線維再生が観察された。

**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 4 件)

1. 内藤素子, 鈴木茂彦  
創傷治癒、雑誌名：再生医療、査読無、11 巻 2012 年 p12-13

2. Aya R, Ishiko T, Noda K, Yamawaki S, Sakamoto Y, Tomihata K, Katayama Y, Yoshikawa K, Kuobta H, Nakamura T, Naitoh M, Suzuki S.

Regeneration of elastic fibers by three-dimensional culture on a collagen sponge scaffold and the addition of latent TGFbeta binding protein 4 to improve elastic matrix deposition. 査読有 Biomaterials. 72:29-37, 2015.

10. 1016/j.biomaterilas.2105.08.036.

[学会発表] (計 8 件)

1. Suzuki S.  
Alternative Techniques in Wound Management-Usefulness of Our Artificial Dermis, Pelnac and Its Further Development. The 8<sup>th</sup> Asia-Panpacific Burn Congress & The 3<sup>rd</sup> Congress of the Asian Wound Healing Association. 2011 年 9 月 11 日～14 日 Bangkok

2. 鈴木 茂彦  
瘢痕・瘢痕拘縮治療の基本的考え方 日本創傷外科学会 2011 年 7 月 8 日～9 日 ホテルルネッサンス札幌

3. 綾 梨乃, 石河利広, 内藤素子, 山脇聖子, 吉川勝宇, 坂元悠紀, 鈴木茂彦  
線維芽細胞の三次元培養による弾性線維の再生 第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 4 日～5 日、ホテルリステル猪苗代

4. 野田和男, 高木恭子, 井上唯史, 藤川雄介, 赤間智也, 内藤素子, 鈴木茂彦, 中邨智

之 Latent TGF $\beta$  binding protein 4 (LTBP-4)は fibulin-5 との相互作用を介して弾性線維形成を促進する 第 34 回日本炎症・再生医学会 2013 年 7 月 2 日～3 日、京都国際会館

5. 綾梨乃、石河利広、内藤素子、野田和男、山脇聖子、吉川勝宇、中邨智之、鈴木茂彦 線維芽細胞の三次元培養において LTBP-4 を添加すると弾性線維の形成が促進される 第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会 2013 年 11 月 7 日～8 日 新潟朱鷺メッセ

6. 綾梨乃、石河利広、内藤素子、野田和男、山脇聖子、吉川勝宇、中邨智之、鈴木茂彦 線維芽細胞の三次元培養における LTBP-4 の弾性線維再生促進作用 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9 日～10 日 松本キッセイホール

#### 7. 鈴木茂彦

形成外科（創傷外科学分野）において臨床応用されているバイオマテリアル 第 37 回バイオマテリアル学会大会 2015 年 11 月 9 日～10 日 京都テルサ

8. 内藤素子、綾梨乃、山脇聖子、片山泰博、坂元悠紀、中邨智之、鈴木茂彦 三次元培養線維芽細胞における LTBP-4 の弾性線維再生促進作用について 第 14 回日本再生医療学会総会 2015 年 3 月 19 日～21 日 パシフィコ横浜

9. 内藤素子、綾梨乃、山脇聖子、野田和男、石河利広、片山泰博、吉川勝宇、坂元悠紀、中邨智之、鈴木茂彦

LTBP4 を用いた線維芽細胞三次元培養系における弾性線維再生 第 36 回日本炎症・再生医学会. 2015 年 7 月 21～22 日 虎ノ門ヒルズフォーラム

10. 綾梨乃、内藤素子、石河利広、山脇聖子、片山泰宏、野田和男、坂元悠紀、中邨智之、鈴木茂彦 ヒト線維芽細胞と LTBP-4 を用いた弾性線維の再生 第 15 回日本再生医療学会総会 2016 年 3 月 17 日～19 日 大阪国際会議場

#### 〔図書〕（計 1 件）

鈴木茂彦、河合勝也  
中外医学社 熱傷治療マニュアル 2013 年 総ページ数 476（うち担当箇所は 262-266）

#### 〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）  
名称：三次元培養弾性線維組織の製造方法  
発明者：鈴木茂彦、内藤素子、石河利広、綾梨乃、平嗣良、  
権利者：グンゼ株式会社、京都大学、  
種類：技術（微生物、その培養処理）  
番号：2012-250258, 公開番号 2014-097007  
出願年月日：2012 年 11 月 14 日  
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 茂彦 (SUZUKI, Shigehiko)  
京都大学・大学院・医学研究科・教授  
研究者番号：30187728

##### (2) 研究分担者

内藤 素子 (NAITOH, Motoko)  
京都大学・大学院・医学研究科・講師  
研究者番号：30378723

河合 勝也 (KAWAI, Katsuya)

京都大学・大学院・医学研究科・准教授  
研究者番号：90273458

##### (3) 連携研究者

中邨 智之 (NAKAMURA, Tomoyuki)  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20362527