

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591918

研究課題名(和文) 5型コラーゲン 3鎖が有する癒着防止活性の治療法への応用

研究課題名(英文) Collagen Type V  $\alpha$ 3 chain applied new therapy for their anti-organ adhesion activity

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究によりV型コラーゲン 3(以下 3(V))は抗線維化と癒着防止活性を有することが示されている。3(V)は羊膜に僅かに含まれており、本実験の目的は3(V)を精製し3(V)を成分とした抗癒着デバイスを開発することであったが、3(V)を無傷で抽出することが困難であり、目的の実現のために3(V)機能的ドメインを部分的に利用することがより現実的であることが示された。また3(V)の特異的発現と抗癒着効果には筋膜由来の細胞が関わっており、この細胞の単離と性状解析を行なった。この実験系の取り組みを通じて幾つかのコラーゲンを構成成分とする再生支援デバイスの原型を造ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Previously we found, collagen Type V  $\alpha$ 3(following 3(V)) is shown to have anti-fibrosis and tissue adhesion inhibition. Their included in an amnion slightly. The aim of this study that, purify from amnion and is to develop novel anti-adhesion devices by utilizing 3(V). However we have any difficulties for extraction of entire 3(V) molecule with kept functions. It was shown that partial 3(V) functional domain is used for more realistic approach in this aims. On the other hand, we have isolated and characterized by muscular fasciae derived cells that, expressed 3(V) and contributed anti-adhesion effect. Additionally, we construct several prototype devices with collagen base for tissue regeneration, in this study.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癒着防止 V型コラーゲン 3鎖 組織線維化

## 1. 研究開始当初の背景

我々は先行研究においてマウスの皮膚創傷治癒時に V 型コラーゲン $\alpha 3(V)$ 鎖(以下 $\alpha 3(V)$ )が皮下/筋膜間に局所的に発現し、抗線維化と癒着防止にはたらいっていることを見出した。 $\alpha 3(V)$ は羊膜とへその緒に多く分布しているが通常の組織には殆どない希少なコラーゲンである。本研究課題の第 1 の目的は羊膜等の組織から $\alpha 3(V)$ 成分を抽出し、それをベースとした新しい埋め込み型の癒着防止素材を開発していくことである。その目的のため、大量の入手が可能で、 $\alpha 3(V)$ の生体効果に必須とみられる N 末の非コラーゲン性球状ドメインにペプシン切断部位が乏しい、ブタ胎児と羊膜を出発材料としてコラーゲンの抽出を行ない、それらを配合したフィルム、スポンジ加工品の試行、動物実験による抗癒着活性の評価を行う実験を計画した。

第 2 の目的は $\alpha 3(V)$ が癒着を防ぐ仕組みの解明であり、その仕組みを利用した抗癒着技術の開発に繋げるものである。創傷時の皮下に特異的な $\alpha 3(V)$ の発現と癒着防止作用において、我々の過去の成果により $\alpha 3(V)$ の発現責任細胞は真皮線維芽細胞ではなく、筋膜結合組織に由来する細胞であるという観察結果が得られており、 $\alpha 3(V)$ を含む細胞外マトリックスの界面に上皮様細胞の遊走(誘導)と被覆効果がみられる。この詳細を検討するため、筋膜に含まれる細胞の単離と培養条件下での活性化、細胞の変化の電子顕微鏡レベルでの観察、 $\alpha 3(V)$  N 末ドメインをコートした培養面への細胞接着試験、マイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的探索を行ない、この細胞のキャラクタライズと癒着防止効果との関係を調べる実験を計画した。

## 2. 研究の目的

2012 年度

ブタ羊膜から完全長に近い $\alpha 3(V)$ の効率的な精製法の確立と、それに並行して抽出コラーゲンを原料とした埋め込み型生体素材の作製、マウスモデルにおける埋め込み実験系のデザインと癒着頻度の評価系を確立することを初年度の取り組みとする。

2013 年度

埋め込み型生体素材の抗癒着活性評価のための動物実験を継続して行い、素材の作製、抽出過程の見直しに還元する。抽出コラーゲンによって形成した素材の品質管理のため、

作製素材の電子顕微鏡的な精査を行う。

並行して $\alpha 3(V)$ を発現する責任細胞とみなされる、皮下筋膜由来細胞の単離と培養下での活性化実験、 $\alpha 3(V)$  N 末蛋白質コーティングによる細胞接着実験を行い、抗癒着活性の細胞生物学的な機序を探索する。

2014 年度

抗癒着活性評価のための動物実験について、効果の比較について集計しまとめる。

単離した筋膜由来細胞について静止期と血清によって活性化したものについて、電子顕微鏡を含めた細胞構造を観察すると同時に発現遺伝子のマイクロアレイに解析を行い、マーカーとなり得る分子の探索を行う。

## 3. 研究の方法

2012 年度

(1)  $\alpha 3(V)$ コラーゲンの精製: ブタ羊膜より完全長 $\alpha 3(V)$ の溶出のためにペプシン抽出法その他、酢酸抽出、尿素抽出、ヒアルロニダーゼ処理の併用等、様々な条件検討を試行し、NaCl 塩析による型別精製を行なった。

(2) コラーゲン素材の埋め込み担体の作製: コラーゲンフィルム、コラーゲンスポンジ、ゲル状担体、液状様々な形式を試作した。

(3) 創傷モデルマウスの作製: 盲腸擦過癒着モデル、体腔内埋め込み癒着モデル、皮膚全層欠損再生モデルの各形式を作製し、状況に見合う埋め込み担体の選択を行った。

2013 年度

(1) 創傷モデルマウスへの抗癒着デバイス埋め込みの動物実験: 2012 年度に作製したコラーゲンデバイスを創傷モデルマウスに移植する実験を行ない、最良の組み合わせと効果に対する評価を行なった。

(2) 筋膜結合組織細胞の単離:  $\alpha 3(V)$ 産生細胞と考えられている、筋膜結合組織細胞を限定的コラゲナーゼ消化法によって単離し、初代培養・血清による活性化、 $\alpha 3(V)$  N 末蛋白を足場とした細胞接着試験を行なった。

2014 年度

(1) 筋膜細胞の発現遺伝子解析: 筋膜結合組織細胞の静止期と活性化後で発現マイクロアレイ解析を行ない、この細胞で発現する特徴的な遺伝子の探索を行った。

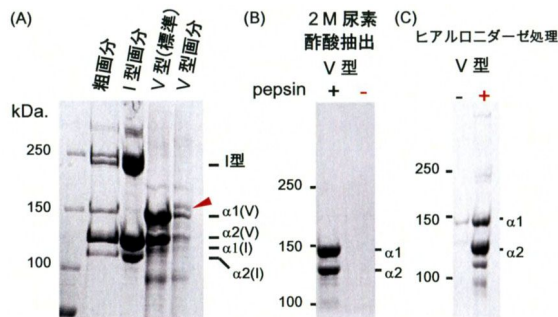
(2) 抽出コラーゲンサンプルの Mass 解析:

抽出コラーゲン品質管理のため、ペプチドマッピング、逆相クロマトグラフィー

LC-Mass 解析を行なった。

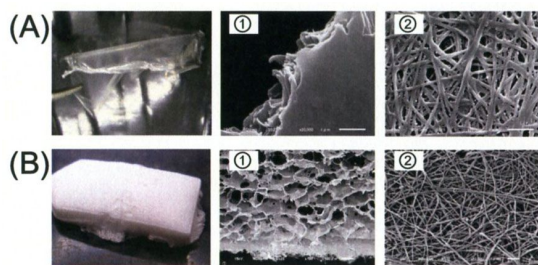
#### 4. 研究成果

図1. ブタ羊膜由来コラーゲンの抽出



(A) 定法のペプシンによる可溶化と塩析によるI・V型コラーゲンの精製を行った。ブタには $\alpha 3(V)$ のN末のペプシン切断配列が乏しいため $\alpha 1(V)$ より高分子量になると予想されたが相当する抽出産物の収量は極めて少量であった(赤矢頭)。(B) V型コラーゲンはペプシンなしで全く抽出できず、(C) 未消化残渣中のV型コラーゲンをヒアルロニダーゼ処理とペプシン抽出を行うことで追加抽出できたが $\alpha 3(V)$ は含まれていなかった。

図2. 埋め込み型生体素材の作製



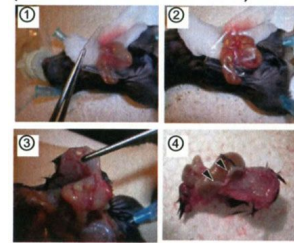
(A) プラスチックフィルムに抽出コラーゲンを塗布し乾燥することでシート体を得た。酸性可溶体を直接乾燥させると無構造に、中性化処理により線維再構築を行ない乾燥させると線維構造をもつ2つのタイプを作製できた。(B) 線維再構築処理と凍結乾燥によりスポンジ体を作製した。水溶性溶媒のまま凍結乾燥させると線維構造のないハニカム構造になり t-butyl alcohol に溶媒を置換して凍結乾燥させると生体に近い線維構造を持つスポンジとなった。これらの分子微細構造の電子顕微鏡写真をそれぞれ示す。

図3. 創傷モデルマウスへのデバイス移植実験

(A) 盲腸擦過による癒着モデルマウスにコラーゲンシートを貼り付ける実験を示す。

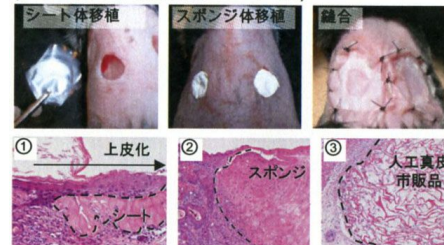
は手術時、は6日後に患部を摘出したもので広範な癒着が観察された。

(A) 盲腸擦過癒着モデル



癒着した盲腸摘出した癒着盲腸と残存したコラーゲンシート(黒矢頭)。癒着防止効果はみられなかった。

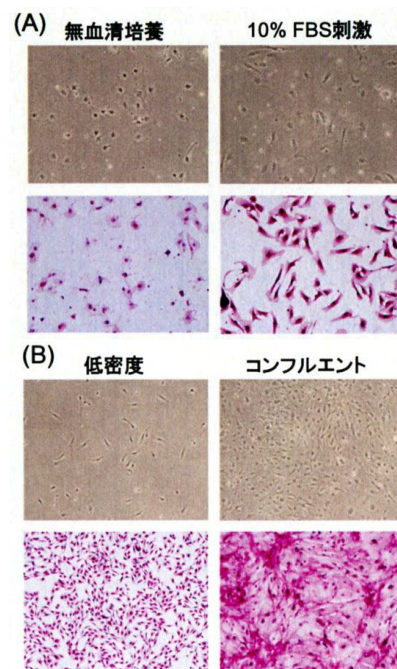
(B) 皮膚欠損創傷再生モデル



(B) 皮膚全層欠損モデルへコラーゲン埋め込みデバイスを貼付け再生を促す実験。シート状デバイスは上皮化の促進、t-butyl alcohol を用いたスポンジは欠損の充填において、市販の真皮欠損用グラフト材(人工真皮)より良好な再生状況を示した。

抗癒着についての効果がみられないため、抽出したV型コラーゲンのペプチドマッピングとLC-Mass解析を行った(2014年)ところ、羊膜由来のV型コラーゲン分画にはV型コラーゲン $\alpha 3(V)$ 鎖の成分が殆ど含まれていないことが分った。その原因として $\alpha 3(V)$ 鎖が、特異的なN末のドメインと他のECM成分が強固に結合していること、ブタでは $\alpha 3(V)$ のN末にペプシン認識配列がないため、ペプシンで可溶化できなかったことが考えられる。

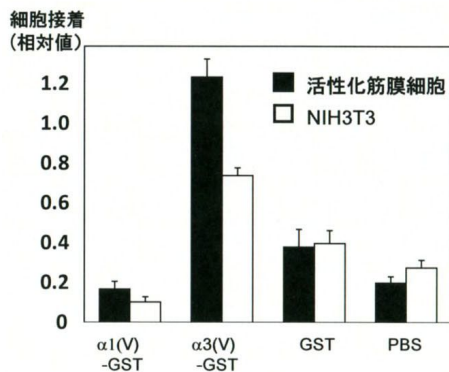
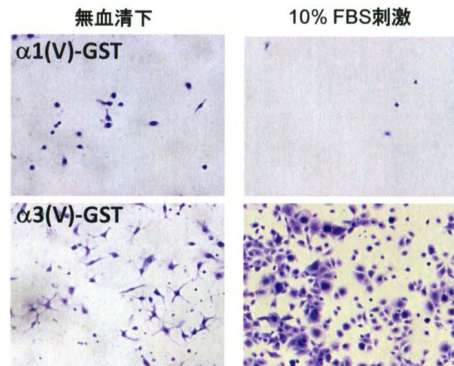
図4. 浅筋膜由来細胞の単離



(A) 生後 1 週マウス皮膚の裏側に付着している筋膜組織からコラーゲナーゼの限定消化 (3mg/ml, 30 分)により遊離してきた細胞から無血清下で dish に接着する細胞のみを単離した。これらの細胞は円形で多数の空胞を有する均一の細胞群であり、無血清下で、この形態を保つが、10%FBS を加えると紡錘形の細胞に変化し増殖する。上段は位相差像、下段はギムザ染色像。

(B) 10%FBS 下で、この細胞を増殖させると低密度では線維芽細胞様の形態を示すが、コンフルエントになると、敷石状となり、線維芽細胞と異なる形態をとる。上段は位相差像、下段はギムザ染色像。

図5.V 型 N 末蛋白の細胞接着性試験



α1(V)とα3(V)の N 末非コラーゲンドメインをグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として作製、アフィニティカラム精製し、培養皿にコーティングを経て、細胞接着性の比較を行った。接着細胞の評価はクリスタルバイレットによる比色定量を用いた。結果として、α3(V)N 末は筋膜細胞を含め、幅広い細胞に対して細胞接着活性を有し、足場を提供することが解った。対してα1(V) N 末には細胞接着活性が殆どみられなかった。興味深いことに静止期の筋膜由来細胞をα3(V)N 末を足場として接着させ

ると細長い足突起を伸展させる等、生体内に近い形状を保持していた (図 5 写真)。

#### マイクロアレイによる筋膜細胞マーカー探索

初代培養化した筋膜由来細胞の発現マイクロアレイを行ない、発現の強い遺伝子をマーカー候補として探索した。基準は静止期か、静止期・活性化時両方で発現が強く、細胞外マトリックス代謝関連と細胞表面蛋白に注目した。候補遺伝子を下に示す。

**Dcn/デコリン** (6.8E+05), **Lum/ルミカン** (1.8E+05), **Gpc1/グリピカン 1** (2.1E+04), **MMP14** (1.26E+05), **MMP2** (6.7E+04), **cc18** (1.1E+05), **Icam1** (1.1E+04), **Vcam1** (1.1E+05), **CD63**(1.5E+05), **CD13**(1.9E+04) ( )内は静止期細胞の発現強度の相対値を示す。筋膜細胞はα3(V)を発現し、創傷部の癒着防止と再生促進に関わっていると考えられる。現段階の単離法では、まだ多くの種類の細胞が混合しているが上記遺伝子はマーカーとして、より詳細な性状解析に用いることができると期待している。

#### 考察

本実験計画はマウス皮膚創傷治癒の事例において、本来胎児期に特異的な V 型コラーゲン α3 鎖が皮下と筋膜の境界部に限局して一過性に発現し、そこから癒着が解消される観察結果を基にしている。

α3(V)は羊膜に多く含まれており、N 末非コラーゲンドメインのもつ細胞接着活性が上皮性細胞の足場となり、解離面を形成すること、α3(V)自体に線維化を阻害する作用がみられることが、抗癒着活性の機序として考えられるため、N 末非コラーゲンドメイン部にペプシン認識配列を持たず、生体試料の調達が容易なブタ羊膜を出発材料とした。

しかしながら、抽出試料の中にα3(V)がほとんど溶出されず 結果、作製した生体埋め込みデバイスには抗癒着活性が得られなかった。溶出に尿素などの変性剤を用いる、ヒアルロニダーゼで糖鎖の切断を行なう等の改善策を施したが、豊富に含まれるα1(V)鎖ですら、ペプシン無しでは全く抽出されてこないことから、V 型コラーゲンの N 末は共有結合も含め、強固に ECM 中に保持されており、N 末を切断解離しないと溶出できないものと考えられた。

研究計画の後半には $\alpha 3(V)N$ 末のGST融合蛋白をもちいて筋膜由来細胞に対する生体作用を調べる実験を行った。筋膜由来細胞は $\alpha 3(V)$ を産生し、肉芽の形成と癒着解消にはたらく重要な役割があり、 $\alpha 3(V)$ はその足場として機能していることが確かめられた。 $\alpha 3(V)$ が筋膜由来細胞の形態と遺伝子発現にどのように影響を及ぼすかはこれからの課題であり、細胞の純化のためのマーカーの整備が必要である。今回の実験計画で機能を持つECM分子を無傷で抽出する難しさを実感した。生体埋め込みデバイスに $\alpha 3(V)N$ 末機能ドメインや機能性ペプチドを人工的に付加した担体を作製し、生体に対する効果を解析していく手法がより現実的である。

コラーゲンをを用いた生体埋め込みデバイスの実験の中で、皮膚欠損再生のモデルで、市販の人工真皮より良好な経過を示したサンプルは、想定外の収穫であった。これはV型コラーゲンの配合と関係なく、コラーゲン担体の形状による効果と考えられている。これらの実験に即して得られた成果も生かし、生体埋め込みデバイスの開発を更に進める。

#### 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5件)

Yamaoka H., Sumiyoshi H., Higashi K., Nakao S., Sumida K., Saito K., Ikoma N., Mabuchi T., Ozawa A., Inagaki Y., :A novel small compound accelerates dermal wound healing by modifying infiltration, proliferation and migration of distinct cellular components in mice, *J. Dermatol Sci.*, 74(3), 204-213, 2014, 査読あり

Nakamura O.M., Hamanaka R., Yano H., Adachi S., Sumiyoshi H., Matsuo N., Yoshioka H., :A new murine osteoblastic cell line immortalized with the SV40 large T antigen, *Cell Tissue Bank*, 15(3), 373-380, 2013, 査読あり

Shimada H., Nambu-Niibori A., Wilson-Morifuji M., Mizuguchi S., Araki N., Sumiyoshi H., Sato M., Mezaki Y., Senoo H., Ishikawa K., Hatano Y., Okamoto O., Fujiwara S., :Epiplakin modifies of the

HeLa cells and accumulates at the outer surface of 3-D cell clusters, *J. Dermatol.*, 40(4), 249-258, 2013, 査読あり

Sumiyoshi H., Kitamura H., Matsuo N., Tatsukawa S., Ishikawa K., Okamoto O., Fujikura Y., Fujiwara S., Yoshioka H., :Transient expression of mouse pro- $\alpha 3(V)$  collagen gene in wound healing, *Connect. Tissue Res.*, 53(4), 313-317, 2012,

Yano H., Hamanaka R., Nakamura M., Sumiyoshi H., Matsuo N., 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, 査読あり

[学会発表](計14件)

住吉秀明, 大塚正人, 木村 穰, 福光 寛, 中尾祥絵, 近田裕美, 紙谷聡英, 稲垣 豊, :ゲノム編集技術を用いた線維肝再生促進因子OGFRL1の機能解析, 第14回日本再生医療学会, 2015年3月19~21日, 横浜市, パンフィコ横浜

住吉秀明, 大塚正人, 木村 穰, 福光 寛, 中尾祥絵, 近田裕美, 紙谷聡英, 稲垣 豊, :ゲノム編集技術を用いた線維肝再生促進因子OGFRL1の機能解析, 第28回肝類洞壁細胞研究会, 2014年12月13~14日, 岡山市, アークホテル岡山

H. Sumiyoshi, A. Kamiya, Y. Inagaki, :Mesenchymal stem cells transplantation using for ideal and /or more efficient approach to therapy liver fibrosis and accelerates regeneration of the impaired liver, The 20<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese society for the research of hepatic cells, JDDW 2014 第22回日本消化器関連学会週間 2014年10月23~26日, 神戸市, 神戸ポートピアホテル

住吉秀明, 東 清史, 中尾祥絵, 皆川香織, 紙谷聡英, 茂呂 忠, 斎藤幸一, 稲垣 豊, :骨髓細胞に由来する新たな肝線維化改善・再生促進因子の同定, 第46回日本結合組織学会, 2014年6月5~7日, 名古屋市, ウィンクあいち

住吉秀明, 山岡華児, 中尾祥絵, 生駒憲広, 馬淵智生, 小澤 晃, 東 清史,

斎藤幸一, 稲垣 豊, :Pirin誘導低分子化合物 HSc025 は細胞増殖と遊走を活性化して創傷治癒を促す, 第 13 回日本再生医療学会, 2014 年 3 月 4~6 日, 京都市, 国立京都国際会議場

H. Sumiyoshi, H. Fukumitsu, R. Higashiyama, S. Nakao, K. Minakawa, M. Sueoka, H. Chikada, A. Kamiya, K. Higashi, K. Saito, Y. Inagaki, :Identification of a novel bone marrow cell derived factor that suppresses fibrogenesis and accelerates regeneration of murine fibrotic liver, The 20<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese society for the research of hepatic cells, 2013 年 9 月 26~27 日, 大阪市, グランキューブ大阪

住吉秀明, 山岡華児, 中尾祥絵, 生駒憲広, 馬淵智生, 小澤 晃, 東 清史, 斎藤幸一, 稲垣 豊, :低分子化合物 HSc025 は細胞増殖と遊走を活性化して創傷治癒を促す, 第 45 回日本結合組織学会, 2013 年 6 月 28~29 日, 和歌山市, 和歌山県立医大

住吉秀明, 三上健一郎, 茂呂 忠, 紙谷聡英, 稲垣 豊, :細胞系譜特異的 Notch / Jagged-1 シグナルによる肝線維化と前駆細胞動員の制御機構, 第 49 回日本肝臓学会総会, 2013 年 6 月 6~7 日, 東京都, 京王プラザホテル

住吉秀明, :くっつけない技術 V 型コラーゲン $\alpha$ 3 鎖を用いて組織・臓器癒着を防ぐ, 2013 年 5 月 8~10 日, 第 12 回国際バイオテクノロジー展/技術会議アカデミックフォーラム, 東京都, 東京ビックサイト

住吉秀明, 瀧澤友里, 中尾祥絵, 三上健一郎, 茂呂 忠, 穂積勝人, 紙谷聡英, 稲垣 豊, :細胞系譜特異的 Notch / Jagged-1 シグナルによる肝線維化と再生の病態形成, 第 12 回日本再生医療学会, 2013 年 3 月 21~23 日, 横浜市, パシフィコ横浜

住吉秀明, :マウス皮膚創傷治癒モデルにおける線維芽細胞とコラーゲンのはたらき 第 3 回機能性食品ペプチド研究会 & 美容・アンチエイジング食品研究会合同学会, 2012 年 3 月 15 日, 東京都, 汐留ビルディング

住吉秀明, 瀧澤友里, 中尾祥絵, 三上健一郎, 茂呂 忠, 山岡華児, 穂積勝人, 紙谷聡英, 稲垣 豊, :細胞系譜特異的 Notch / Jagged-1 シグナルによる肝

線維化と再生の病態形成, 第 20 回浜名湖シンポジウム, 2012 年 12 月 22~23 日, 浜松市, アクトシティ浜松

住吉秀明, 福光 寛, 東山礼一, 中尾祥絵, 皆川香織, 茂呂 忠, 山岡華児, 瀧澤友里, 東 清史, 斎藤幸一, 稲垣 豊, :骨髄細胞に由来する新たな肝線維化改善・再生促進因子の同定と臨床応用, 第 11 回日本再生医療学会, 2012 年 6 月 12~14 日, 横浜市, パシフィコ横浜

福光 寛, 東山礼一, 住吉秀明, 稲垣 豊, :骨髄細胞に由来する新たな肝線維化改善・再生促進因子の同定と臨床応用, 第 48 回日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 7~8 日, 金沢市, ホテル日航金沢, ANA クラウンプラザホテル金沢他

〔図書〕(計 3 件)

稲垣 豊, 茂呂 忠, 住吉秀明, :肝線維化改善の分子・細胞基盤, 肝胆膵, 68(5), 709-715, 2014, 著書 査読なし

住吉秀明, 稲垣 豊, :マウス皮膚創傷治癒モデルにおける筋膜由来線維芽細胞と希少コラーゲンのはたらき, 食品加工技術, 33(3) pp22-28, 2013, 著書 査読なし

住吉秀明, 稲垣 豊, コラーゲン分子種と線維症形成へのかかわり, 医学のあゆみ, 244(6), pp515-520, 2013, 著書 査読なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 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: 6 0 3 4 3 3 5 7

### (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: 8 0 1 9 3 5 4 8