

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13028

研究課題名(和文) 脱細胞化生体組織を利用した移植細胞の生着補助材料の開発

研究課題名(英文) Development of supportive materials for engraftment of transplanted cells using decellularized tissue

研究代表者

根岸 淳(Negishi, Jun)

信州大学・学術研究院繊維学系・助教

研究者番号：60722634

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)：成体ブタと胎児ブタを原料とする脱細胞化組織粉末の機能比較により、成体ブタ脱細胞化組織と比較して胎児ブタ脱細胞化組織粉末が高い創傷治癒誘導能を有していることが明らかになった。また、原料組織により脱細胞化組織粉末の機能が異なり、成体ブタと胎児ブタ脱細胞化心筋粉末、成体ブタ脱細胞化骨格筋粉末と比べ、成体ブタ脱細胞化肝臓粉末と胎児ブタ脱細胞化肝臓粉末、胎児ブタ骨格筋粉末が生体内で血管新生を促進することが見いだされた。以上から、脱細胞化組織粉末を用いた細胞生着補助材料の応用可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発する細胞担体材料により、移植細胞や臓器への血管新生を伴う創傷治癒誘導が可能になり、移植細胞や臓器の生着率向上と組織再生誘導の基盤技術提案が可能になる。また、血管新生と創傷治癒誘導を示した脱細胞化組織の成型加工により、生体内の任意の部位に血管新生と創傷治癒を誘導する材料開発が可能になり、疾患部への血液供給を必要とする末梢血管疾患や心筋梗塞の治療法としての応用展開が期待される。加えて、研究例の少ないブタ胎児皮膚や骨の機能評価から、優れた皮膚の癒着防止材料や、既存骨グラフトでは困難な軟骨内骨化を誘導する材料の開発につながる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Functional comparison of decellularized tissue powders from adult and fetal porcine revealed that fetal porcine decellularized tissue powders have higher wound healing-inducing ability than adult porcine decellularized tissue powders. In addition, the function of decellularized tissue powder varies depending on the source tissue, and compared to adult and fetal porcine decellularized myocardial powders and adult porcine decellularized skeletal muscle powder, adult and fetal porcine decellularized liver powders and fetal porcine decellularized skeletal muscle powder promote angiogenesis in vivo. From the above, the applicability of the cell engraftment support material using the decellularized tissue powder was shown.

研究分野：生体材料学

キーワード：細胞外マトリックス 創傷治癒 細胞移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

事故や疾患で損傷した組織や臓器の治療として、細胞移植による組織や臓器の再生が期待されている。近年、心筋梗塞部や角膜内皮損傷部への細胞シート移植が検討され、細胞を用いた組織再生の実現が近づいている。しかし、大きな欠損治療を目的とした大量の細胞移植では、細胞が高密度に存在するため、細胞生存に必要な血液が不足し、移植細胞の生着率が低いことが問題となっている。また、ヒトや動物の組織は、細胞とコラーゲンなどの細胞外マトリックスで構成されており、3次元組織の再生には細胞とともに細胞外マトリックスの役割を担う材料が必要だと考えられている。

本研究では、生体組織から免疫原である細胞を取り除いた脱細胞化組織を加工した脱細胞化組織加工材料を作製し、創傷治癒と血管新生を誘導する細胞担体材料としての基盤確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究課題では、成体または胎児ブタの組織と臓器から脱細胞化組織粉末を作製し、細胞試験及び動物試験により血管新生と創傷治癒誘導を解析、脱細胞化組織を成型加工した創傷治癒誘導材料の開発に取り組み、研究期間内に以下の項目を目標とした。

血管新生と創傷治癒を誘導する脱細胞化組織加工材料の移植細胞生着補助材料としての応用可能性を明らかにする。

成体と胎児由来組織を利用し、原料動物発生段階による脱細胞化組織粉末の血管新生ならびに創傷治癒誘導機能の差について明らかにする。

様々な組織と臓器から作製した脱細胞化組織粉末の原料組織及び臓器特異的な血管新生と創傷治癒誘導機能について明らかにする。

3. 研究の方法

成体及び胎児ブタの肝臓、心臓、骨、軟骨、骨髄、骨格筋を採取、高静水圧処理と凍結乾燥、粉碎処理を行い、脱細胞化組織粉末を作製した。HE染色と残存DNA定量を行い、各組織からの細胞除去を評価した。また、SDS-PAGEを用いて脱細胞化組織の構成物を比較解析した。細胞試験(細胞毒性、細胞遊走性、骨細胞分化、脂肪細胞分化)とラット皮下埋植試験により、各脱細胞化組織の特性を解析した。

4. 研究成果

(1)未処理および各脱細胞化組織の残存DNA量をPicoGreen®を用いて定量した。未処理組織と比較して、各脱細胞化組織のDNA量が減少していることが示され、高静水圧処理により細胞が除去されたことが明らかになった。また、未処理組織において、成体ブタ由来組織と比べて胎児由来組織の含有DNA量が多いことが明らかになった。さらに、凍結乾燥と粉碎機による粉碎により、すべての脱細胞化組織を粉末化することが可能だった。

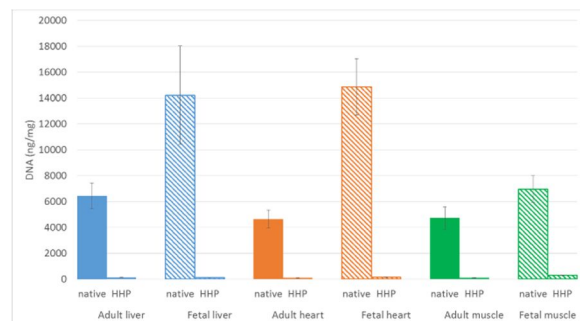


Fig. 1. 残存DNA量

(2)細胞毒性試験において、脱細胞化組織粉末添加群の線維芽細胞数はコントロールと有意差がなく、脱細胞化組織粉末には細胞毒性がないことが明らかになった。創傷治癒に関連する細胞遊走性評価において、脱細胞化心筋、脱細胞脂肪および成体由来脱細胞化骨格筋添加群では、ポジティブコントロールと比べ、優位に遊走細胞数が少なかった。一方、脱細胞化肝臓および胎児由来脱細胞化骨格筋添加群では、ポジティブコントロールと同等の遊走細胞数だった。原料組織、原料動物の年齢により、脱細胞化組織の細胞遊走性が異なることが明らかになり、脱細胞化肝臓、脱細胞化胎児骨格筋が高い創傷治癒誘導機能を有する可能性が示唆された。

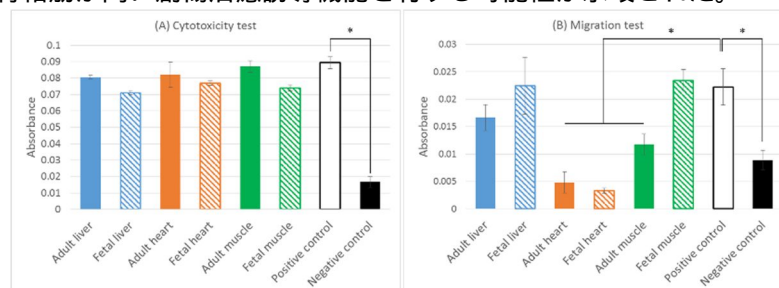


Fig. 2. (A)脱細胞化組織粉末添加後の生細胞数と(B)脱細胞化組織粉末添加後の遊走細胞数 (* $p < 0.05$)

(3) 各脱細胞化組織粉末の生理食塩水抽出液を骨芽細胞様細胞に添加、一定期間培養後に骨細胞分化を評価した。アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性評価において、脱細胞化骨、軟骨と骨髄抽出液添加群の活性上昇が認められ、成体ブタ脱細胞化組織と比較して、胎児ブタ脱細胞化組織抽出液添加群の ALP 活性が高いことが明らかになった。さらに、アリザリンレッド染色により、脱細胞化組織抽出物添加群において、石灰化が生じていることが確認され、脱細胞化骨、軟骨と骨髄、特に胎児ブタ脱細胞化骨、軟骨と骨髄が高い骨形成誘導能を有することが示唆された。

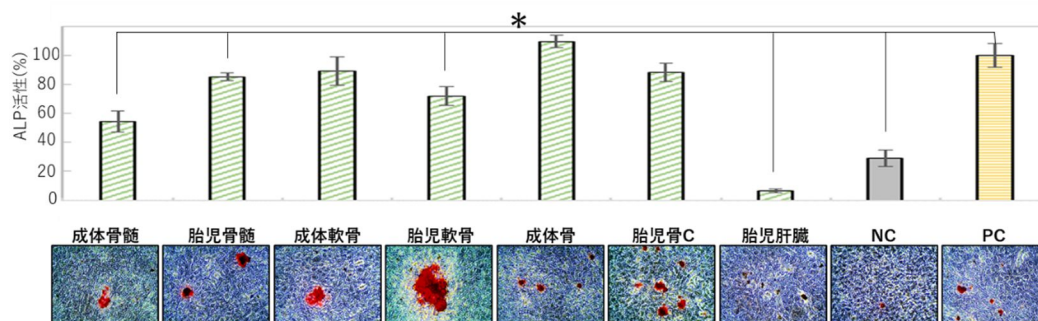


Fig. 3. 脱細胞化組織添加後の骨芽様細胞の ALP 活性とアリザリンレッド染色画像

(4) マウス横紋筋細胞に各脱細胞化組織粉末の生理食塩水抽出液を添加、一定期間培養後に筋管形成を評価した。脱細胞化肝臓抽出液添加群と比較して、脱細胞化骨格筋抽出液添加群において顕著な筋管構造が認められ、脱細胞化骨格筋が高い筋管形成誘導能を有することが示唆された。

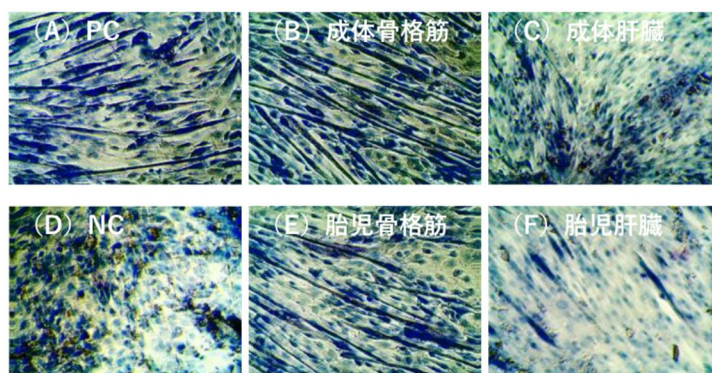


Fig. 4. 脱細胞化組織粉末添加後のマウス横紋筋細胞

(5) 脱細胞化組織粉末と蛍光標識ラット脂肪由来幹細胞を混合、同種ラット皮下に埋植し、一定期間飼育後に蛍光観察を行い、組織再生を評価した。所見評価において、脱細胞化肝臓粉末群と胎児脱細胞化骨格筋群では、サンプル表面の血管新生が認められた。一方、脱細胞化心筋と成体脱細胞化骨格筋群では、ほとんど血管新生は認められず、組織種により血管新生誘導能が異なることが明らかになった。蛍光観察では、事前に標識した蛍光が観察されず、移植後の細胞挙動を解析することができなかった。

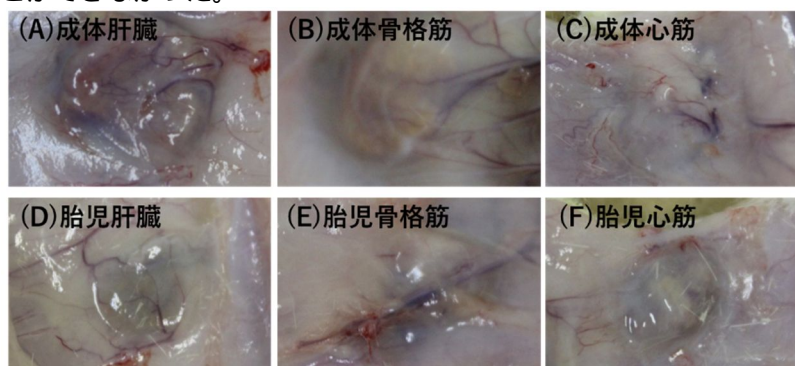


Fig.5. 皮下埋植 14 日後の脂肪由来幹細胞含有脱細胞化組織粉末の所見評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. Funamoto, Y. Hashimoto, A. Kishida, J. Negishi	4. 巻 107
2. 論文標題 A Fibrin-Coated Pericardial Extracellular Matrix Prevented Heart Adhesion in a Rat Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res B Appl Biomater	6. 最初と最後の頁 1088-1094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.34201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 根岸 淳, 橋本 良秀, 張 永巍, 山下 暁立, 船本 誠一, 岸田 晶夫
2. 発表標題 フィブリン糊被覆脱細胞化心膜による心臓-胸壁間の癒着防止
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根岸淳
2. 発表標題 Evaluation of adult and fetal porcine decellularized tissues
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Biomedical Engineering
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----