

博士論文（要約）

生体内の異物被包化組織体（biosheet）を用いた
組織再生メカニズムの解析

鈴木啓介

【序文】生体内組織形成術 (in-body tissue architecture, iBTA) は生体内で異物が被包化される現象を利用し、非吸収性の材料を鋳型として生体の皮下組織に埋入し周囲に線維性組織体を作成する手法である。鋳型の形により様々な形状の組織体を作成可能であり、チューブ型の biotube、シート型の biosheet の他、心臓や血管の弁の形状をした biovalve も開発されている。biotube は主に血管再生に応用され、動物実験で biotube を血管に吻合し移植すると血管内皮や弾性線維、平滑筋細胞の遊走などの組織再生が生じる。また、角膜、腹壁、膀胱などで biosheet を用いた組織再生が報告されている。

私と共同研究者は biosheet や biotube を小児外科疾患の再生医療に応用することを目指してきた。先天性気管狭窄症に対する気管再生を目的として、家兎の気管壁の欠損に biosheet を自家移植すると 4 週後に軟骨と気管上皮が再生することを確認した。また、先天性横隔膜ヘルニアに対する横隔膜再生を目的に、家兎の 15mm 四方の横隔膜欠損に biosheet を自家移植したところ 12 週後に横紋筋の再生を認めた。このように、biotube や biosheet は移植した臓器に応じた組織再生を誘導できるが、一方で血管以外の臓器では安定した組織再生が得られず臨床応用が難しいのが現状である。この一因に biotube や biosheet に組織再生が起きるメカニズムについて知見が乏しいことが挙げられる。

そこで本研究では、組織再生に適した条件を見出すために、biosheet の組織再生メカニズムを解明することを目的とし、マウスの biosheet 中に存在する細胞の解析と、タンパク質の網羅的解析を行い、組織再生に関与する因子を検索した。さらに、biosheet を用いたマウスの皮膚再生モデルを確立し、着目した因子と biosheet の組織再生の関連性を検討した。

第 1 章 biosheet の細胞のフローサイトメトリー解析

【背景】間葉系幹細胞 (mesenchymal stem/stromal cell, MSC) は様々な臓器の間葉組織に存在し、主に中胚葉組織への多分化能を有する。biosheet による横隔膜の筋組織や気管軟骨などの間葉組織の再生を確認していることから、MSC が存在し組織再生に関与していると考え biosheet の細胞の表面マーカーの解析と多分化能の評価を行った。

【方法】6 週齢、雌の C57BL/6J マウスの背部皮下にシリコンの板状の鋳型を埋入した。1 週、2 週、4 週後に鋳型周囲に形成された組織を摘出し、それぞれ 1w-biosheet、2w-biosheet、4w-biosheet とした。biosheet の比較対照としてマウスの背部皮下の結合織 subcutaneous fascia (以下、fascia) を採取した。

1w、2w、4w-biosheet、fascia より細胞を単離し、MSC について CD31、CD45 を陰性マーカー、Sca-1、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD146 を陽性マーカーとして表面マーカーのフローサイトメトリー解析を行った。さらに 2w-biosheet の細胞のうち CD31、CD45 に陰性の間質細胞を分取し、第 1 継代細胞を用いて骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導を行った。

【結果】① biosheet の細胞のフローサイトメトリー解析 : biosheet からは $1.3 - 3.0 \times 10^6$ cell/cm² の細胞が単離され、fascia と比較して 10 倍以上に細胞数が増加し ($p < 0.001$)、特

に 1w-biosheet での増加が顕著であった。細胞表面マーカーは biosheet 中の CD45、CD31 に陰性の間質細胞に、Sca-1、CD90、CD29、CD44 に共陽性を示す細胞集団 (quadruple-positive cells) を認めた。間質細胞中の quadruple-positive cells の存在比率は biosheet で有意に高かった (1w-biosheet 64.2 %, 2w-biosheet 57.5 %, 4w-biosheet 37.6 %, fascia 4.8 %, $p < 0.01$)。

② biosheet の間質細胞の分化誘導：染色による評価では骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への各分化誘導で一部に染色される細胞や基質の形成を認めた。リアルタイム RT-PCR により各々の分化マーカーの遺伝子発現を解析すると、Bglap 42 - 113 倍 ($p = 0.007$)、Adipoq 122 - 129 倍 ($p < 0.001$)、Col2a1 12.3 - 14.2 倍 ($p = 0.007$) と有意に発現の増加を認めた。

【考察】biosheet に MSC に特徴的な細胞表面マーカーを有する細胞や多分化能を有する細胞が含まれたことから、MSC が存在することが示唆された。MSC は自身の多分化能の他に、周囲の組織に対する免疫制御、抗炎症、抗線維化などの作用を有しており、biosheet でも組織の修復・再生に必要な環境を整えていると考えた。

第 2 章 biosheet のプロテオーム解析

【背景】プロテオーム解析は生体の組織や細胞中のタンパク質の情報を網羅的に解析することである。biosheet に対してプロテオーム解析を行い組織再生に関与するタンパク質を検索した。

【方法】2w、4w-biosheet、fascia よりタンパク質を抽出し、トリプシンでペプチド断片化した後に、液体クロマトグラフィー質量分析計を用いてタンパク質の同定と定量を行った。3 検体ずつ解析し fascia と比較して fold change > 2 かつ $p < 0.05$ を上昇、fold change < 0.5 かつ $p < 0.05$ を低下しているタンパク質とした。

【結果】① biosheet のプロテオーム解析結果：9,048 種類のタンパク質が同定され、2w-biosheet で 1,455 種類のタンパク質が上昇、869 種類が低下、4w-biosheet で 1,274 種類が上昇、772 種類が低下していた。上昇したタンパク質の Gene ontology 解析では 2w-biosheet ではタンパク質の翻訳に関するものが、4w-biosheet では免疫・炎症反応や、細胞外マトリックスの合成に関わるものが多く含まれた。パスウェイ解析では悪性腫瘍に関するパスウェイに有意差を認め、細胞増殖の亢進が示唆された。この悪性腫瘍のパスウェイに含まれるタンパク質の中で、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) が biosheet のみで検出され fascia では測定感度以下であった (2w-biosheet: $p = 0.025$, 4w-biosheet: $p = 0.013$)。その他、神経修復に関与する細胞外マトリックスのタンパク質である Tenascin-C が有意に上昇していた (2w-biosheet: fold change 115, $p = 0.050$, 4w-biosheet: fold change 98, $p = 0.026$)。

② biosheet の HGF の定量と免疫組織化学解析：ELISA 法による定量では、HGF は 1w、2w、4w-biosheet とともに fascia と比較し約 10 倍の有意な上昇を認めた ($p < 0.001$)。免疫組織化学染色では、biosheet に HGF 陽性細胞が多数存在し、biosheet の鋳型に面する側に

HGF と特異的受容体 c-MET に共陽性を示す密な層の形成を認めた。

【考察】組織再生に関連して biosheet で HGF と Tenascin-C の上昇を認め、biosheet 内に HGF 陽性の細胞や組織を確認した。HGF は細胞増殖・遊走、管腔形成、血管再生の他、抗炎症、抗線維化など多様な作用を有している。重症下肢虚血や脊髄損傷に対し HGF を用いた再生医療が開発されており、biosheet においても組織再生との関与が示唆された。

第 3 章 biosheet のマウス皮膚再生モデルによる HGF と組織再生の関連性の解析

【背景】biosheet の組織再生と HGF の関連性を検証するため、biosheet を用いたマウス皮膚再生モデルを作成し検討した。

【方法】C57BL/6J マウスの背部に径 6 mm の皮膚全層欠損を作成した。GFP 陽性マウス由来の 2w-biosheet または fascia を移植し、表皮再生に差があるマウス皮膚再生モデルを作成した。このモデルを用いて① 皮膚再生過程における HGF と c-MET の発現を免疫組織化学染色により解析し、② fascia の移植時に recombinant mouse HGF (rmHGF) を局所投与し皮膚再生の促進効果を検証した。

【結果】① マウス皮膚再生モデルの作成：biosheet を皮膚欠損部に移植すると fascia に比べて上皮化が促進し、術後 14 日目に biosheet では欠損部全面が上皮化し創残存率に有意差を認めた ($p = 0.03$)。組織学的に biosheet では厚い表皮が再生され、表皮下には密な細胞と膠原線維からなる組織が形成された。この組織は血管新生を伴い移植した biosheet の GFP 陽性の細胞が存在した。fascia と表皮再生に差を認めたため biosheet の皮膚再生モデルとした。

② 皮膚再生モデルの HGF、c-MET の発現の解析：皮膚再生モデルで biosheet を移植した皮膚欠損部で術後 14 日目に創中央部に形成された組織は、免疫組織化学染色で HGF と c-MET に共に陽性を示し血管新生を伴った。fascia を移植した欠損部では主に HGF、c-MET に陰性の組織からなり血管新生を認めなかった。

③ 皮膚再生モデルを用いた HGF による皮膚再生の促進効果の検討：マウス皮膚再生モデルの fascia を移植した皮膚欠損部に手術時に rmHGF 50 ng を単回局所投与すると、非投与群と比較し術後 14 日目の創残存率は有意に縮小した ($19.3 \pm 2.9 \%$ vs $35.8 \pm 5.0 \%$, $p = 0.02$)。組織学的には創辺縁部に HGF と c-MET に陽性を示し血管新生を伴う組織の増生を認め、biosheet 移植時に表皮下に形成された組織と類似していた。

【考察】biosheet の皮膚再生モデルにおいて、表皮の再生過程で HGF と c-MET に陽性を示す血管新生を伴う組織が形成されること、fascia に rmHGF を添加して移植すると表皮再生が促進し biosheet の移植に類似した効果を認めたことから、HGF が血管新生や角化細胞の増殖・分化を促進することで biosheet の表皮再生に関与していると考えた。

【結論】biosheet の組織再生に関与する因子として MSC と HGF、Tenascin-C が着目され、HGF と皮膚再生の関連性について示した。biosheet を臓器欠損に移植すると MSC や

HGFによる炎症、線維化が抑制され、さらにHGFによる血管新生やTenascin-Cによる神経修復が促進し再生に必要な環境が整えられる。その上で正常組織から遊走した組織前駆細胞がHGFの作用によって増殖・分化し、組織再生が進行するメカニズムが推察された。皮膚以外の組織の再生モデルも確立してさらなる解析が必要であるが、再生メカニズムの解明により確実に安定した組織再生を誘導する条件・方法を見出し、小児外科疾患に対しbiosheetやbiotubeを用いた新たな再生医療を提供することが期待される。