足場材コラーゲン分子のペプチド修飾により基底膜成分を付与した高機能化口腔粘膜インビトロモデルの開発

鈴　木　絢　子*

Development of Highly Functionalized Oral Mucosa *In Vitro* Model with Basement Membrane Component by Peptide-coated Collagen Scaffold

Ayako SUZUKI*

To develop a highly-functionalized tissue-engineered oral mucosa (TEOM) possessing basement membrane component, instead of our initial plan using fuorination, this study examined the effect of peptide coating (CPPP-RGDTFI) on the attachment between the collagen scaffold and an overlying newly-formed epithelium. When the TEOM using non-treated scaffold was fixed into a formalin solution, the newly-formed epithelium was detached from the scaffold, which is a usual event. In contrast, the epithelium of TEOM did not separate from using the peptide coating collagen scaffold, suggesting the peptide coating enhanced the attachment between the collagen and the oral mucosa epithelium. Histological examination is underway.

１．研究背景と目的

上皮細胞と線維芽細胞を含む培養皮膚では、細胞相互作用で界面に基底膜が形成されるが、界面は平坦で上皮脚と結合組織乳頭から構成される真皮-表皮接合は再現されておらず、これを再現した再生医療製品は前例がない。申請者はこれまで魚うろこコラーゲン足場材の開発に取り組み、コラーゲン足場材に微細な波状構造（マイクロパターン）の付与に成功し、上皮脚構造をもつ培養口腔粘膜を開発した（特願 2018-242505: 2018 年 12 月 26 日）。一方、散見される課題は培養口腔粘膜作製後の上皮剥離である。その解決策として基底膜の再現が欠かせないと考え本研究の着想に至った。具体的解決策として注目したのがアミノ酸のフッ素化である（石田 康博, 有機合成化学協会誌, 2020 ）。魚うろこコラーゲンのペプチド鎖をフッ素原子に置換した 4(R)-フルオロプロリン非天然アミノ酸を含むペプチドを合成することで、ラミニン、タイプ IV コラーゲンといった基底膜成分を足場材のコラーゲン表面に結合させることができると考えた。

しかし、コラーゲン分子のフッ素化は仮説通りに働かず、途中でコラーゲン表面分子をペプチド修飾する方法に変更した。基底膜成分を足場材に付与するプランではないが、コラーゲンのペプチド修飾により口腔粘膜上皮細胞が発現しているインテグリンに結合する RGD モチーフを付与して、細胞の接着活性が上がることを期待して、コラーゲン製材に各種ペプチド修飾を行い、最も接着活性の高いペプチドを用いて高機能化口腔粘膜インビトロモデルの開発を目的とする。

２．実験手法

修飾に使用する多くのペプチドのうち、上皮系の HaCaT 細胞で試験したことのある RGDTFI（インテグリンに結合）と AG73（シンデカンに結合）を候補とした。予備実験で AG73 は HaCaT 細胞に毒性を示した。一方、統計学的解析は時間の関係で実施しなかったが、RGDTFI では細胞の接着活性が未処理プレートより高い傾向が見られたので、RGDTFI をこの後の培養口腔粘膜作製に用いることとした。使用するコラーゲンはマイクロパターンが付与されていない、平坦なコラーゲンを用いた。表面が平坦なコラーゲンに播種して再生する培養口腔粘膜は、嵌合効力が発揮されないのため、通常は固定時に上皮剥離が起きるのでその有無でペプチド修飾の効果を確認することとした。

2024年2月29日 受理
* 豊田理研スカラー
新潟大学大学院医歯学総合研究科（歯学系）生体組織再生工学分野

ペプチド修飾コラーゲンシートの作製

48-well サイズのコラーゲンシートを 1 枚ずつ 24-well plate の well に移し、1 mL の PBS に浸した。コラーゲンシートにマレイミド基を導入するため、それぞれのシートに 300 µL の Milli-Q 水に溶解した 4.1 µmol のマレイミド化試薬（sulfo-SMCC）を加えた。室温で 30 分反応させた後、シートを 1 mL の PBS で 3 回洗浄した。次に、30 nmol のペプチド（CPPP-RGDTFI）を含む 1 mL の PBS を加え、一晩室温で反応させた。この CPPP-RGDTFI はインテグリン結合性細胞接着配列である RGDTFI の N 末端に、プロリン 3 残基のスペーサーを介してシステインが導入されたものである。このシステイン側鎖のチオール基がコラーゲンシート上のマレイミド基と反応し共有結合する。ペプチドの結合後、シートを 1 mL の PBS で 3 回洗浄し、細胞培養実験に用いた。ペプチド修飾のイメージを図 1 に示した。

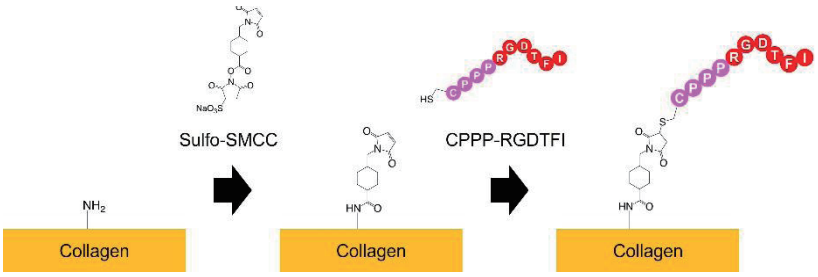

図 1　ペプチド修飾のイメージ図.

口腔粘膜角化細胞の培養は、患者様からご提供頂いた歯肉から角化細胞を単離しヒト初代培養細胞を用いて培養を開始する。タイプ IV コラーゲン溶液に一晩浸漬した、表面平坦な魚うろこコラーゲン製足場材に細胞を播種し、我々の「ヒト培養口腔粘膜作成プロトコールに準じて 11 日間培養した培養口腔粘膜を作製し、ホルマリンで固定した。

3．実験結果および考察

培養口腔粘膜作製中の最初4日間の液相培養、その後7日間続く気相液相培養中にコラーゲン足場材の未処理群とペプチド修飾群に肉眼的な違いは認めなかった。図 2 上段に7日目の写真を示したが、両者とも表面は平坦ではなく、播種した上皮細胞が重層化している様子が間接的にうかがえる。培養11日目で完成となった培養口腔粘膜をホルマリン液で固定した。その時の様子を図 2 下段に示した。左の未処理群では、平坦なコラーゲン足場材で作製した培養口腔粘膜におこる、形成された上皮細胞層の剥離が観察された。完全に分離すると、上皮細胞層は疎水性なのでホルマリン液に浮いたまま、一方コラーゲン製材は沈む。しかしながら、ペプチド修飾群では、鑷子で液中に培養口腔粘膜を押し込んでも、右の写真のように上皮細胞層とコラーゲン製材が剥離、分離することなく一体化したままで、平坦な表面に対して、コラーゲンと上皮層が強固に接着していることが示唆された。上皮の疎水性により培養口腔粘膜は浮いたままであった。

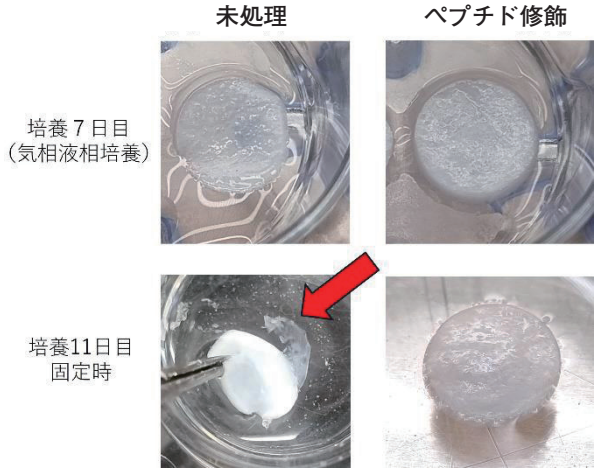

図 2　培養口腔粘膜の肉眼的観察.

4．今後の展望

真皮-表皮接合構造の再現に加え、基底膜成分を足場材に再現することは、口腔上皮幹細胞ニッチを創生でき、口腔粘膜インビトロモデルの高機能化につながり、究極の生体模倣した足場材の開発につながる。途中で実験計画を変更したことから、ペプチド修飾したコラーゲン足場材を用いた培養口腔粘膜は現在切片作製途中で、時間の関係で最低限の HE 染色を施した組織像を示すまでに至っていないが、近日中に、HE 染色、免疫組織化学的および電子顕微鏡学的観察を加えて、上皮と足場材の界面に、基底膜成分や基底膜構造の有無を確認する予定である。ペプチド（CPPP-RGDTFI）修飾の 3 次元培養モデルにおける接着性向上効果が組織/細胞レベルで確認された暁には、マイクロパターン付のコラーゲン足場材もペプチド化を施し、CollaWind 社における製品展開へつなげる。また、タイプ IV コラーゲン溶液のほかにラミニン-511 など、作製前に異なる基底膜成分の浸漬や、細胞サイドのインテグリン発現の点でも接着効果を判定したい。

REFERENCES

1) A. Suzuki, Y. Kodama, K. Miwa, K. Kishimoto, E. Hoshikawa, K. Haga, T. Sato, J. Mizuno and K. Izumi, *Sci Rep,* **10** (2020) 2219231.
2) 泉　健次，鈴木絢子，岸本一真，水野　潤，小松隆史，大澤康暁，特願2021-054133，2021年3月26日出願.
3) Y. Yamada, T. Onda, Y. Wasa, K. Hamada, Y. Kikkawa and M. Nomizu, *ACS Omega,* **8** (2023) 4687-4693.
4) Y. Yamada, T. Onda, A. Hagiuda, R. Kan, M. Matsunuma, K. Hamada, Y. Kikkawa and M. Nomizu, *FASEB J,* **36** (2022) e22389.