

平成 29 年度 修士論文

弾性線維再生用基材としての
Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の開発

三重大学大学院 工学研究科 博士前期課程

分子素材工学専攻

井上 綱太

目次

1章. 諸言

1-1 再生医療と組織工学	1
1-2 3次元足場材料を用いた組織工学	2
1-3 弾性線維	3
1-4 弾性線維組織	5
1-4-1 皮膚	
1-4-2 血管	
1-4-3 靭帯・腱	
1-4-4 肺	
1-4-5 弾性軟骨	
1-5 生体組織の力学特性	14
1-6 細胞外マトリックス	16
1-6-1 エラスチン(Elastin)	
1-6-2 フィブリリン(Fibrillin)	
1-6-3 コラーゲン(Collagen)	
1-7 本研究の目的	23

2章. 方法

2-1 水溶性 Elastin の抽出	24
2-1-1 シュウ酸による水溶性 Elastin の抽出	
2-1-2 弾性率による水溶性 Elastin の分画	
2-1-3 凝集温度による水溶性 Elastin の分画	
2-1-4 Elastin コーティングシャーレの接触角測定	
2-2 水溶性 Fibrillin の抽出	25
2-2-1 2-メルカプトエタノールによる水溶性 Fibrillin の抽出	
2-2-2 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成分析	
2-2-3 Elastin・Fibrillin の最適比率決定	
2-2-4 Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	
2-2-5 Western blot (WB)	
2-2-6 分光蛍光光度計による測定	
2-2-7 水溶性 Fibrillin Gel の作製	

2-2-8	水溶性 Fibrillin の凝集温度測定	
2-2-9	Nuclear magnetic resonance (NMR)	
2-2-10	Fibrillin コーティングシャーレの接触角測定	
2-2-11	水溶性 Fibrillin の粘度測定	
2-2-12	水溶性 Fibrillin のクロマトグラフィー	
2-2-13	Rhodamine B isothiocyanate(RBITC)ラベル化 Fibrillin の作製	
2-3	高温架橋による Elastin Gel の作製 (A Gel)	29
2-4	低温架橋による Elastin Gel の作製 (A Gel)	29
2-5	貫通孔を持つ Elastin Gel の作製 (AE Gel)	29
2-7	低温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製 (AX Gel)	29
2-8	貫通孔を持つ Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製 (AEX Gel)	30
2-9	作製した Gel の評価方法	30
2-9-1	力学的強度測定 (弾性率・伸長率測定)	
2-9-2	ゲル化時間測定	
2-9-3	走査型電子顕微鏡 (SEM) による構造観察	
2-9-4	共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による構造観察	
2-9-5	動物実験による Elastin Gel の生体適合性の確認	
2-10	細胞培養	34
2-11	細胞毒性試験	34
2-12	2次元培養後の Real-Time PCR による遺伝子発現解析	35
2-13	Hydro Gel 内での細胞の3次元培養	35
2-13-1	Hydro Gel 内での細胞培養	
2-13-2	PicoGreen Assay による細胞増殖試験	
2-13-3	3次元培養後の Real-Time PCR による遺伝子発現解析	
2-13-4	免疫蛍光染色	
2-13-5	蛍光顕微鏡による細胞包埋 Gel の観察	
2-14	統計処理	37

3章. 結果

3-1	水溶性 Elastin の抽出	38
3-2	水溶性 Fibrillin の抽出	39
3-3	水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画	40
3-3-1	水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成分析	
3-3-2	Elastin・Fibrillin の最適比率決定	
3-3-3	高温架橋 Fibrillin Gel の作製	
3-3-4	低温架橋 Fibrillin Gel の作製	
3-3-5	Fibrillin 含有率の検量線作製	
3-3-6	水溶性 Fibrillin の凝集温度測定	
3-3-7	Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	
3-3-8	Western blot (WB)	
3-3-9	分光蛍光光度計による測定	
3-3-10	水溶性 Fibrillin コーティングシャーレの接触角測定	
3-3-11	Nuclear magnetic resonance (NMR)	
3-3-12	水溶性 Fibrillin の粘度測定	
3-3-13	水溶性 Fibrillin のクロマトグラフィー	
3-3-14	水溶性 Fibrillin の NMR	
3-3-15	Rhodamine B isothiocyanate(RBITC)ラベル化 Fibrillin の作製	
3-3-16	水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画のまとめ	
3-4	低温架橋による Elastin Gel の作製(A Gel)	95
3-4-1	力学的強度測定	
3-4-2	ゲル化時間測定	
3-5	貫通孔を持つ Elastin Gel の作製(AE Gel)	98
3-5-1	力学的強度測定	
3-5-2	膨潤度測定	
3-5-3	走査型電子顕微鏡 (SEM) による構造観察	
3-5-4	共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による構造観察	
3-5-5	平均孔径の測定	
3-5-6	AE Gel の輝度解析	
3-5-7	空隙率の測定	
3-5-8	動物実験による生体適合性の確認	
3-6	高温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製 (AX Gel)	118
3-6-1	力学的強度測定	

3-6-2	膨潤度測定	
3-6-3	異なる架橋倍率の Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製	
3-7	低温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製 (AX Gel)	123
3-7-1	力学的強度測定	
3-7-2	膨潤度測定	
3-7-3	異なるインキュベート温度による力学的強度の変化	
3-7-4	異なる加速剤濃度の Gel の力学的強度変化	
3-7-5	異なる架橋剤濃度の Gel の力学的強度変化(後付け架橋)	
3-7-6	ゲル洗浄後溶液の NMR 測定	
3-7-7	Dode-DSP 添加 DMEM による力学的強度変化(後付け架橋)	
3-8	貫通孔を持つ Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製 (AEX Gel)	149
3-8-1	力学的強度測定	
3-8-2	Dode-DSP 洗浄による AEX Gel の力学的強度の変化(後付け架橋)	
3-8-3	共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による構造観察	
3-9	細胞毒性試験	166
3-9-1	Dode-DSP による細胞毒性試験	
3-9-2	DSP による細胞毒性試験	
3-10	2 次元培養後の Real-Time PCR による遺伝子発現解析	170
3-11	Hydro Gel 内での細胞の 3 次元培養	173
3-11-1	PicoGreen Assay による細胞増殖試験	
3-11-2	3 次元培養後の Real-Time PCR による遺伝子発現解析	
3-11-3	蛍光顕微鏡による細胞包埋 Gel の観察	

4章. 考察

4-1	水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画	183
4-1-1	シュウ酸処理回数の異なる水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成分析	
4-1-2	シュウ酸処理回数の異なる水溶性 Fibrillin の弾性率・伸長率・凝集温度	
4-1-3	シュウ酸処理回数の異なる水溶性 Fibrillin の分子量	
4-1-4	水溶液 Fibrillin と水溶性 Elastin の蛍光波長分布	
4-1-5	水溶性 Fibrillin のシステインの分解	
4-1-6	水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画まとめ	
4-2	加速剤のゲル化時間・弾性率・伸長率への影響	196
4-3	Elastin Gel 内の貫通孔の形状	198
4-4	ElastinE 複合 Gel の貫通孔形成	200
4-5	Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の構造	203

4-6	Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の力学的特性	204
4-7	後付け架橋によるゲルの力学的強度の上昇	206
4-8	3次元培養後の細胞応答	210
4-9	今後の展望	211
5章	結論	213
6章	謝辞	214
7章	参考文献	215

1章.諸言

1-1 再生医療と組織工学

人体の臓器や組織が深刻な疾患や損傷に対して臓器移植がおこなわれてきたが、移植技術の進歩により、移植を希望する患者は激増している。しかし、世界的にドナーの数は不足しているというのが現状であり、日本においても臓器の提供を待つ患者は約 13,000 人であり、それに対して移植を受けられる患者は、年間約 300 人といわれている。¹⁾ 運良く臓器提供を受けられたとしても、拒絶反応をコントロールするため生涯にわたって免疫抑制剤を飲み続けなければならず、それに伴う感染症や腎不全、発がんの恐れに絶えずいなまれることになる。²⁾ また、臓器不足を解消するために様々な人工臓器が開発されているが、生体適合性や生体機能代替性の不足などまだまだ課題は多い。

このような現状を解決するために近年では「再生医療(Regenerative Medicine)」が注目されている。人体は創傷の治癒や部分切除された肝臓の再生など、ある程度であれば壊れた組織を再生する力を備えている。³⁾ 再生医療は細胞を利用して臓器や組織を再生・修復するという治療法である。この再生医療において重要な要素として、「細胞(Cells)」・「増殖因子(Cytokine)」・「足場材料(Scaffold)」の 3 つが挙げられる。これらの 3 つの要素を組み合わせ、臓器や組織を再生する技術を組織工学(Tissue Engineering)という。(Fig.1-1)

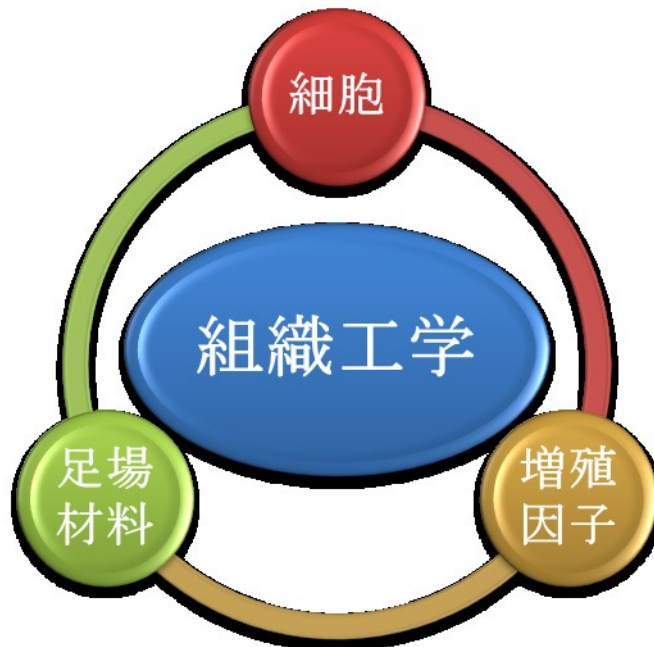


Fig.1-1 組織工学

1-2 3次元足場材料を用いた組織工学

生体内で、細胞はエラスチンやコラーゲンなどの線維性タンパク質、グリコサミノグリカンなどの複合糖質、フィブロネクチンなどの接着タンパク質などから構成されている細胞外マトリックス(Extracellular matrix:ECM)に囲まれており、このマトリックスを通じて、周囲の細胞と情報交換しながら生体恒常性を維持する。損傷した組織は、細胞とともに細胞外マトリックスが失われる。失われた細胞外マトリックスは人工的に提供し組織再生を助けるものが3次元足場材料である。損傷した組織に直接細胞を注入し、傷を治す治療方法も考えられるが、大きい欠損に対して単なる細胞注入だけでは細胞遊走や周囲の組織の侵入による組織再生の妨害、再生組織の形状制御が困難などの大きな問題が残されている。そこで、再生の空間を確保し、再生組織の形状を維持する3次元培養足場材料が必要となる。

3次元足場材料には細胞の接着・増殖・基質産生を促進して細胞の分化を制御できることおよび生体に悪影響を及ぼさない性質として、生体適合性・高い強度・多孔質性などの性質が要求される。また、増殖した細胞と産生された細胞外マトリックスが組織化され新しい生体組織が形成されると人工物である3次元足場材料は邪魔になるので、組織形成とともに分解・吸収される生体吸収性が要求される。⁴⁾

再生医療に用いられる3次元足場材料には三リン酸カルシウムやヒドロキシアパタイトを除いて、ほとんどが高分子材料である。生体吸収性高分子は合成高分子と天然高分子の2種類に分けられる。合成高分子はポリ乳酸(PLA)・ポリグリコール酸(PGA)・ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(PLGA)、天然高分子はコラーゲンなどが3次元多孔質足場材料として再生させたい組織の形に加工され使用されている。コラーゲンのような生体吸収性天然高分子は高い細胞接着・増殖促進活性などを持っているが、力学的強度が合成高分子に比べて低いという問題点がある。

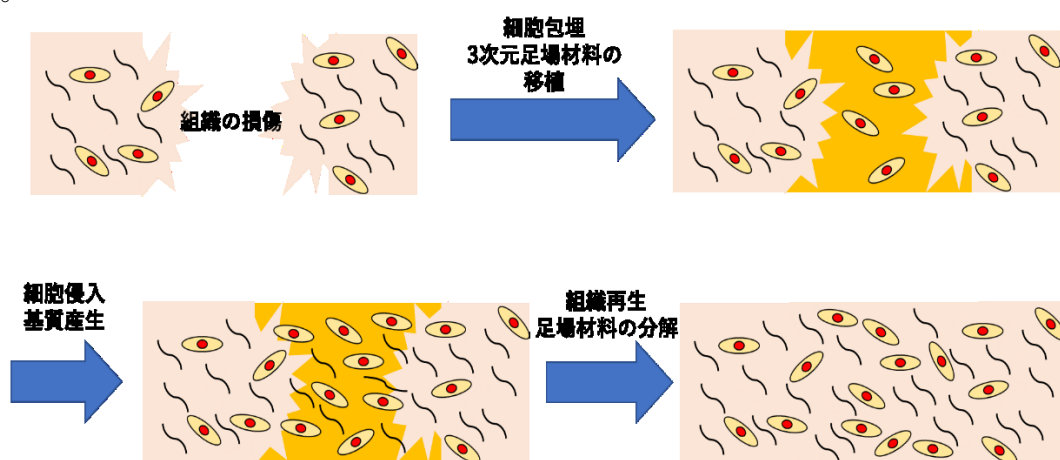


Fig.1-2 組織工学による組織の再生過程

1-3 弾性線維(Elastic fibers)

弾性線維はコラーゲンからなる膠原線維とともに結合組織の主要な線維成分であり、生体内の各組織・器官に広く分布している。主にエラスチンとマイクロフィブリル(フィブリリン)から構成され、弾性や伸縮性に寄与している。弾性線維の直径は $10\mu\text{m}$ 以下であり、組織によって異なっている。マイクロフィブリルは直径 $10\sim 12\text{nm}$ の細線維であり、エラスチンが沈着する足場となり、架橋や形成を助けている。マイクロフィブリルのみから構成されるオキシタラン線維、少量のエラスチンと多量のマイクロフィブリルから構成されるエラウニン線維、多量のエラスチンと少量のマイクロフィブリルから構成される弾性線維の3種類は弾性系線維とされている。⁵⁾⁶⁾ (Fig.1-3)

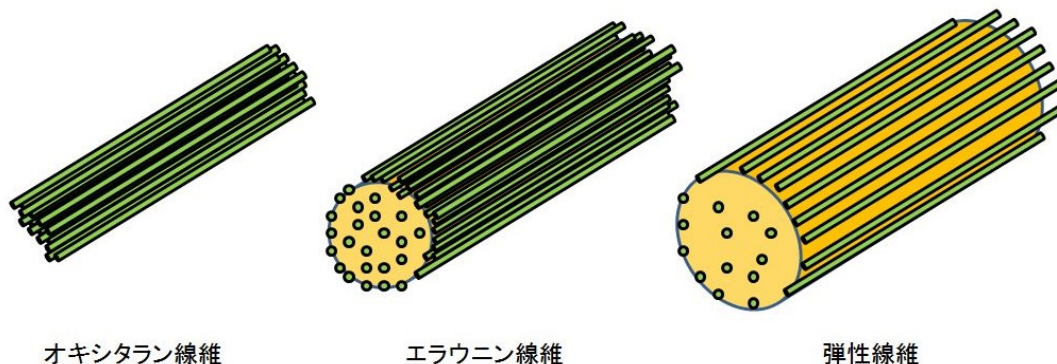


Fig.1-3 弾性系線維

①オキシタラン線維 (Oxytalan fibers)

オキシタラン線維はマイクロフィブリルの集合体であり、エラスチンの沈着は見られない。歯根膜、血管外膜、神経上膜、神経周膜、腱、鼓膜、毛様体、真皮などの結合組織で観察されている。また、エラスチンには及ばないがマイクロフィブリル自身も弾性的性質を持っている。このため、オキシタラン線維は組織構造の支持作用や組織の弾性・膨張調節作用をしていると考えられている。

②エラウニン線維 (Elaunin fibers)

エラウニン線維はマイクロフィブリル間に少量のエラスチンが沈着している。歯肉、血管の弾性板、弾性軟骨、腱、真皮に存在し、生体組織ではオキシタラン線維と弾性線維をつなぐ線維の小集団のように観察されている。それより、オキシタラン線維から成熟弾性線維へと移行するときの中間体のように存在すると考えられる。

③弾性線維 (Elastic fibers)

弾性線維は血管の動脈や靭帯、肺など内外から圧力がかかりやすく弾性や伸縮性が必要とされる組織に存在している。オキシタラン線維はエラスチンを含まないため他との区別は簡単であるが、エラウニン線維と弾性線維は共にエラスチンとマイクロフィブリルを含んでいるため明確に区別することはできない。

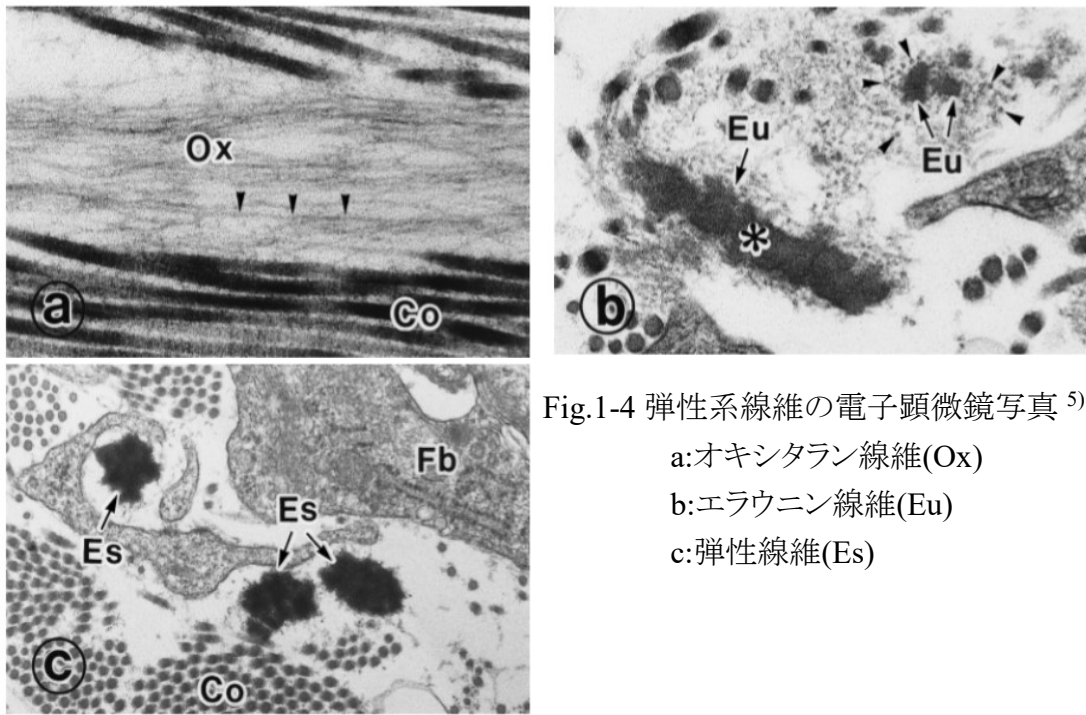


Fig.1-4 弾性系線維の電子顕微鏡写真⁵⁾

- a:オキシタラン線維(Ox)
- b:エラウニン線維(Eu)
- c:弾性線維(Es)

弾性線維の形成は線維芽細胞・平滑筋細胞・血管内皮細胞・弾性軟骨の軟骨細胞などによって行われる。弾性線維が形成されるには、初めに細胞からフィブリリンが分泌されマイクロフィブリルが形成される必要がある。マイクロフィブリルが足場となり分泌されたエラスチンの前駆体であるトロポエラスチンが沈着することを助け、分子を大きくさせる。凝集したトロポエラスチンは銅を必要とする酵素のリシルオキターゼの作用により、リシン残基を中心に分子間の架橋が起こり、エラスチン特有のアミノ酸であるデスマシンとイソデスマシンが形成される。この反応が進むことにより弾性線維は形成されている。⁷⁾ (Fig.1-5)

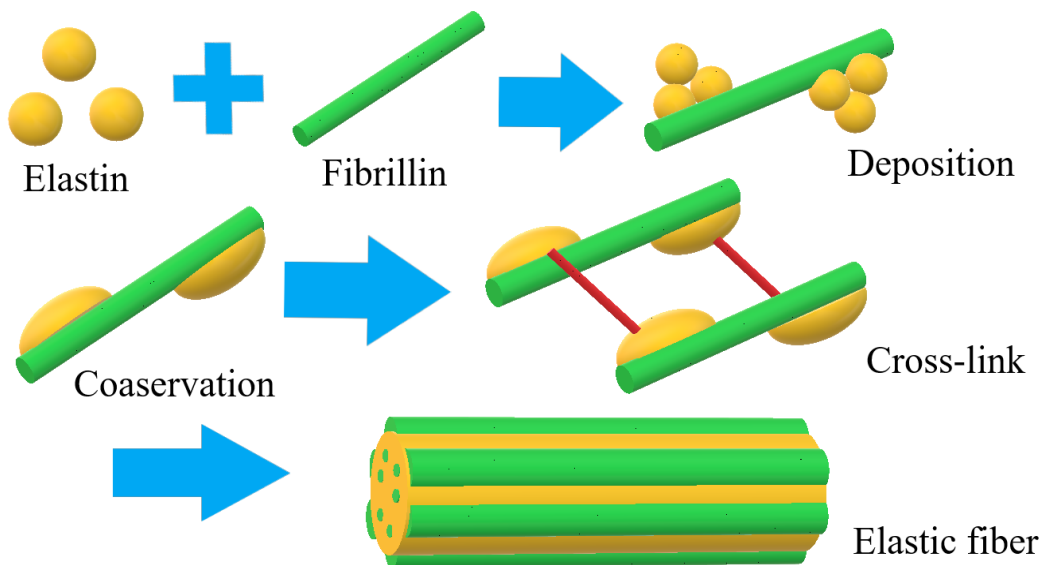


Fig.1-5 弾性線維形成過程

1-4 弾性線維組織

1-4-1 皮膚(Skin)

皮膚は人体の最外層にあり、外界との接点で外部からの刺激から人体を保護する大切な役割を担っている。しかし、皮膚は単なる壁ではなく、吸収、排泄など様々な機能を持つ、人体を構成する臓器の一つである。皮膚は全身の表面に広がっており、内臓と呼ばれる臓器とは構造も機能も大きく異なる。身体の外層にあり、外壁として紫外線、気温の変化、湿度の変化、種々の化学物質、微生物の攻撃などのあらゆる外からのものに反応し、身体を守っている、体表面積は成人で平均 1.6m² あり、皮膚の重量は皮下の脂肪組織を加えると成人平均約 9kg となる、人体最大の臓器である。皮膚の断面で見ると大きく表皮・真皮・皮下組織の 3 つに分けられる。⁸⁾

皮膚は常に張力が付加された状態にあり、その大きさは 0~20N/m と見積もられていて、切り出すと 5~30%短縮する。また、ほぼ全身にわたってランゲル線と(Langer line)と呼ばれる割線が存在し、この方向に沿ってエラスチンとコラーゲンが配向しているのでこの方向で聴力が高く、硬い。⁹⁾

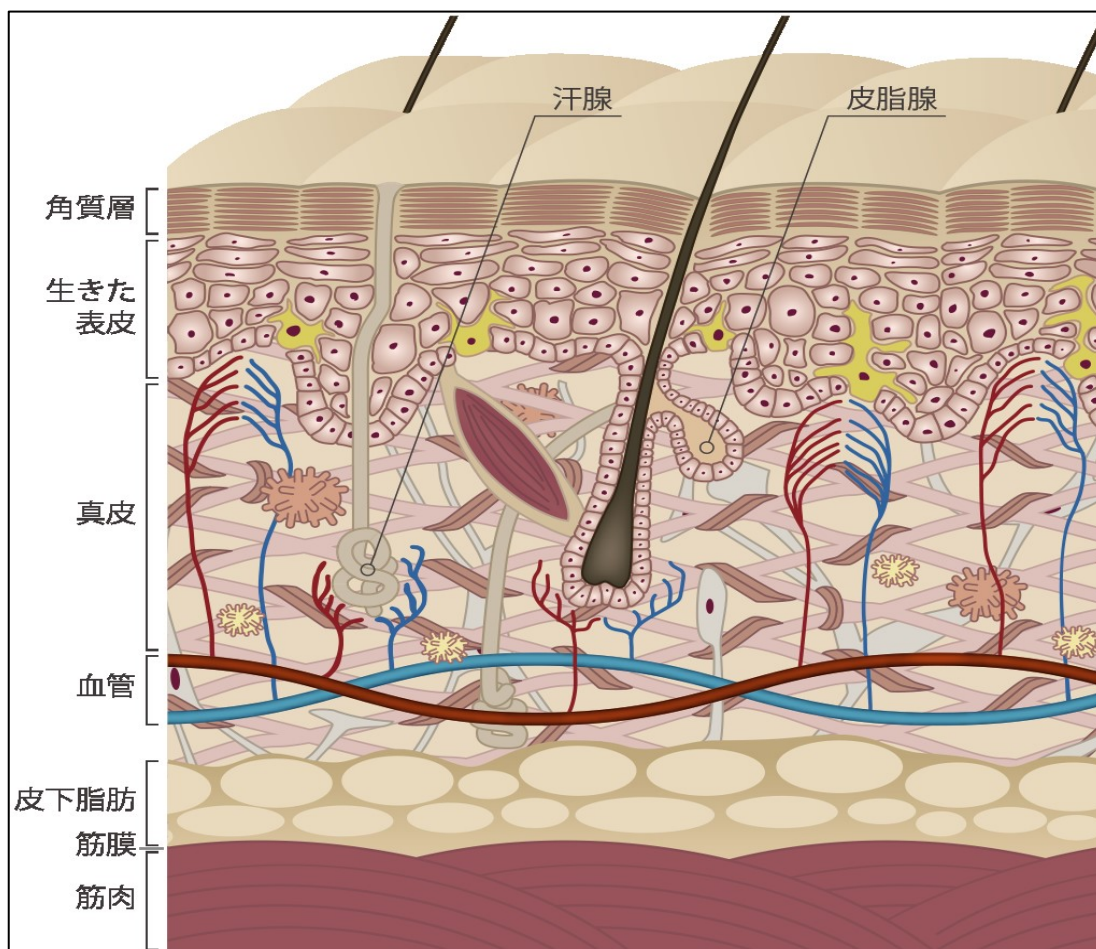


Fig.1-6 皮膚の構造¹⁰⁾

①表皮(Epidermis)

表皮は細胞が多層に重なって平均 0.2mm の厚さのシート状構造をつくっている組織である。表皮と真皮の境界面は凹凸面となっており、表皮のシートの中に真皮が突起(真皮乳頭)を伸ばしている。表皮の 95%は表皮ケラチノサイト(keratinocyte: 角化細胞)で、残りの 5%はメラノサイト(melanocyte:色素細胞)、ランゲルハンス細胞(Langerhans cell)、 α 樹状細胞、メルケル細胞などが含まれる。

ケラチノサイトは表皮の最下層で分裂し、ケラチンを作りながら上層に移動し表層から脱落していく。この間ケラチノサイトは形態的に変化し、上層から角質細胞層・顆粒細胞層・有棘細胞層・基底細胞層の 4 種類に分類される。

角質細胞層は核や細胞小器官が自己消化により消失したケラチノサイトの約 10 層の薄膜状構造である。重層化した細胞は最外層で垢となり、はがれ落ちる。

顆粒細胞層は有棘細胞層の上、角質細胞層の下にある 2~3 層の細胞層である。球形の層板顆粒(オドランド小体)がみられ、この中に含まれる脂質が細胞間隙に放出され酵素の働きを受けて角質細胞間脂質となる。

有棘細胞層は基底細胞層の上、顆粒細胞層の下に至る 5~10 層であり、表皮の大部分を占める。隣接する細胞同士がデスモソームで結合している。上方に行くほど扁平化する。

基底細胞層は表皮最下層の 1 層の基底細胞からなる。基底細胞は縦に長い円柱形の細胞であり、クロマチンに富み楕円形の核を有している。基底細胞の 3~5%が分裂し、2 個に分かれた 1 個が上昇して有棘細胞となり角化が進行していく。隣接する細胞と結合する構造としてデスモソーム裂隙構造(ギャップジャンクション)、基底細胞下にある基底膜と結合する構造としてヘミデスモソームがある。透明帯、基底板、係留線維(VII型コラーゲン)を介して真皮の I, III型コラーゲンと強固に結合している⁸⁾

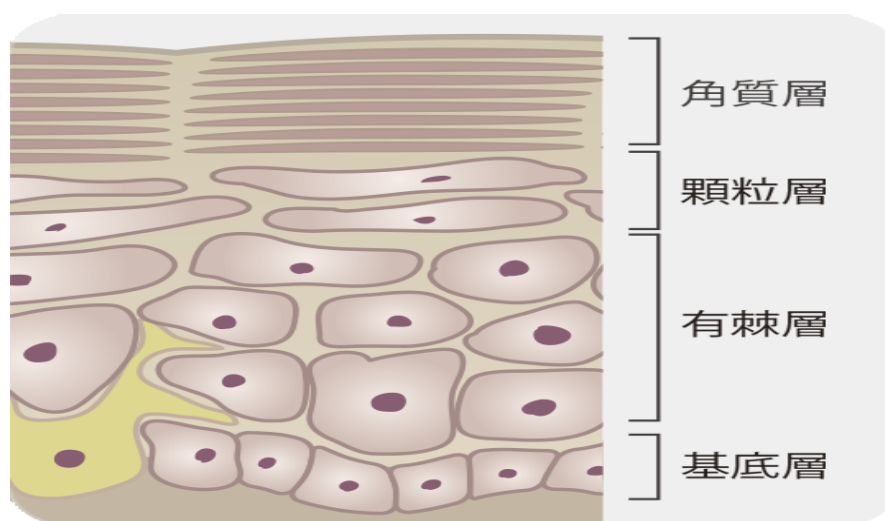


Fig.1-7 表皮の構造¹⁰⁾

②真皮(Dermis)

真皮は表皮の下、皮下組織の上に位置する構造で乳頭層(papillary layer)、乳頭下層(subpapillary layer)、網状層(reticular layer)の3層からなる。厚さは表皮の15~40倍で主に細胞外マトリックスからなり、その中に包み込まれるように線維芽細胞、脈管、神経や皮膚付属器などの細胞成分が存在する。

真皮を構成する主体は線維芽細胞の産生した膠原線維でその間にある弾性線維が皮膚の張りを与えている。この真皮の細胞外マトリックスは膠原線維(コラーゲン分子: I型コラーゲンが80%、III型コラーゲンが15%、残りの大部分がV型コラーゲン)と弾性線維からなる線維成分以外にも、その間を埋めるグリコサミノグリカンとプロテオグリカンが間質を構成する。特にグリコサミノグリカンのヒアルロン酸は強い親水性を持ち、皮膚に張りを与える。⁸⁾

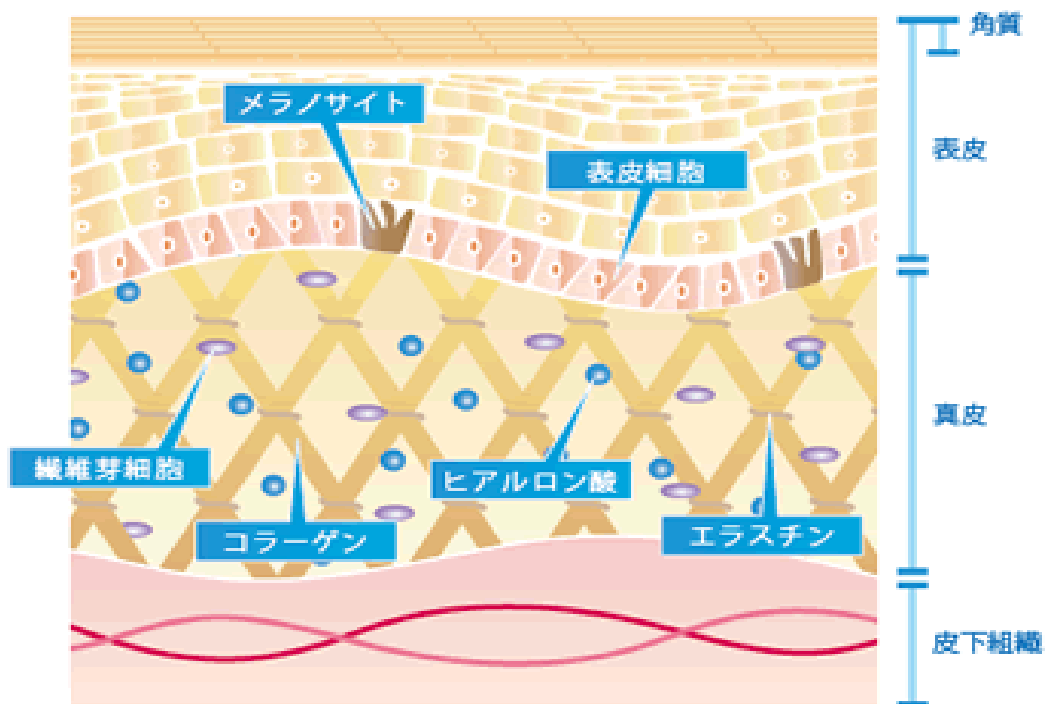


Fig.1-8 真皮の構造¹¹⁾

③皮下組織(subcutaneous tissue)

皮下組織は真皮と筋膜に挟まれた部位で脂肪の貯蔵、外力に対するクッション、体温喪失の遮断などの役割を果たしている。脂肪細胞は細胞質に脂肪滴を多量に含み核は辺縁に押しやられている。脂肪細胞は結合組織の隔壁によって取り囲まれた脂肪小葉と呼ばれる集塊をなす。皮下組織の厚さは身体の部位や年齢によって異なる。⁸⁾

1-4-2 血管 (Blood vessel)

血管は全身に血液・酸素・栄養分・老廃物・水分を運ぶための器官である。血管は動脈、静脈、およびそれぞれの末端をつなぐ微小血管(毛細血管)からなる。血管は内膜、中膜、外膜の3層から構成され、内膜は血管内皮細胞、中膜は血管平滑筋細胞あるいは周皮細胞および弾性線維、膠原線維、外膜は線維芽細胞および弾性線維、膠原線維からなる。血流を調節する動脈では中膜筋層が発達し、血液を貯留する静脈では中膜および外膜の線維が発達している。血圧調節や物質交換にあずかる微小血管では、内皮細胞や平滑筋細胞あるいは周皮細胞などが径や臓器の違いに応じて著しい形態変化を示す。¹²⁾

内膜は1層の扁平な細胞である血管内皮細胞からなり、血管の透過性、凝固能、血管のトーンスの調節、炎症の制御、再生など血液の流れを適正に保ち生体の機能を維持するための機能を担っている。

中膜は弾性線維、膠原線維、血管平滑筋細胞からなり、弾性板と平滑筋層が同心円状に何層も交互に重なる構造となっている。隣り合う弾性板は筋層を通る弾性線維によって結合している。平滑筋は血管の円周方向に配向して血管を収縮させ、血管径を変化させて血流量の調節に寄与する

外膜は弾性線維、膠原線維、線維芽細胞からなり、脈管(血管栄養血管)と呼ばれる、大血管に栄養を供給する小血管網が存在する。

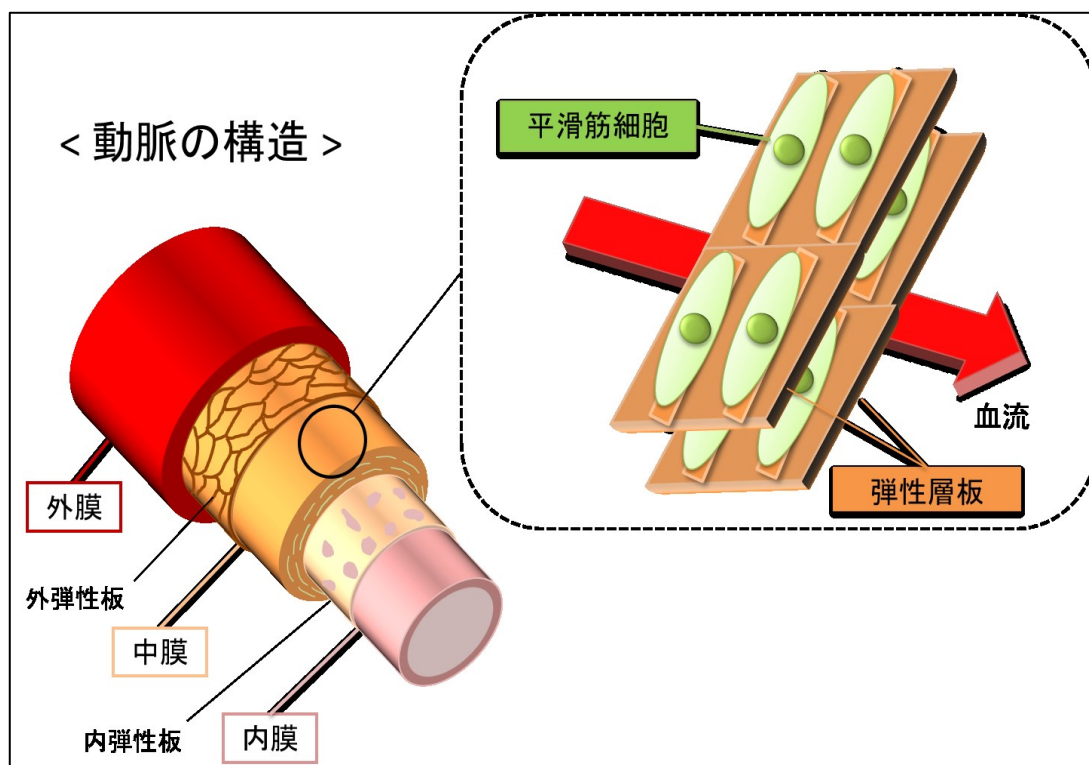


Fig.1-9 血管の構造¹³⁾

1-4-3 靱帯・腱(Ligament・Tendon)

靱帯は関節にあり骨と骨を連結し、その安定性を維持しつつ必要な動作を行わせる組織である。ヒトの膝関節には4つの靱帯組織(Ligament)が存在し、関節の内側では前十字靱帯(ACL: Anterior Cruciate Ligament)と後十字靱帯(PCL: Posterior Cruciate Ligament)が、関節の外側では内側側副靱帯(MCL: Medial Collateral Ligament)と外側側副靱帯(LCL: Lateral Collateral Ligament)が大腿骨(Femur: 太もも側)と脛骨(Tibia: すね側)を連結しており、どれもが膝の安定性に寄与している。

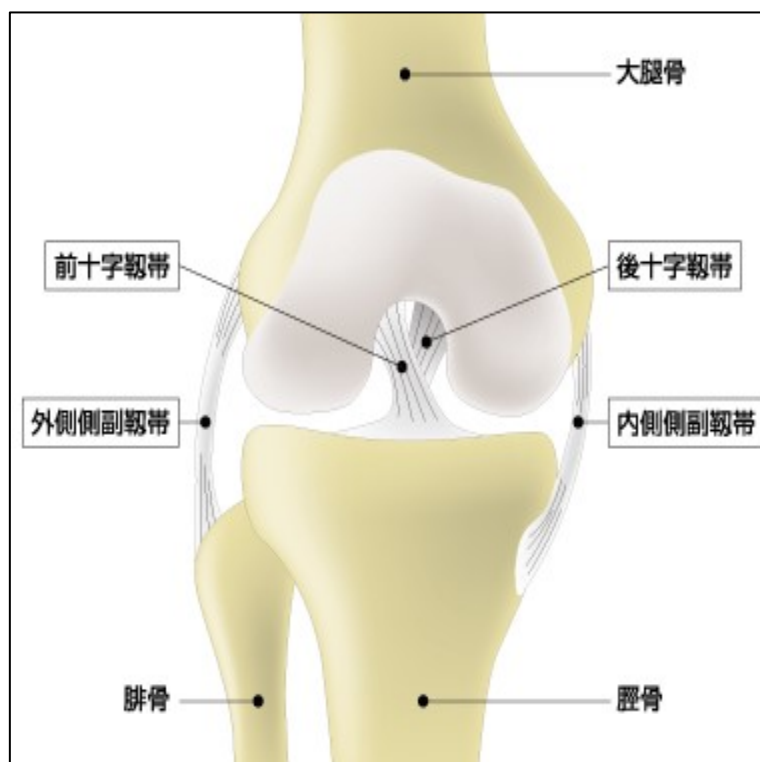


Fig.1-10 膝靱帯の構造¹⁴⁾

腱は骨格筋と骨を連結し、関節において筋の収縮と弛緩によって関節を動かすとともに過度な関節の運動を制限している。特にふくらはぎにある腓腹筋・平目筋を、かかとの骨に付着させるアキレス腱は人体最大の腱である。アキレス腱が断裂すると歩行が不能になる。



Fig.1-11 腱の構造¹⁵⁾

膝関節は靭帯と腱によって安定な構造を保ちつつ、前後方向 (Anterior-Posterior)、内側－外側方向 (Medial-Lateral)、近位－遠位方向 (Proximal-Distal) の並進成分と、屈曲・進展 (Flexion-Extension)、内・外 (Varus-Valgus)、内・外旋 (Internal-External) の回転成分の合計 6 自由度の運動が可能となる。

靭帯と腱は解剖学的には異なるが、組成や組織は非常に似ている。これらは重量の 60～80% が水分であり、その他はエラスチンやコラーゲンのような線維タンパク質、線維芽細胞やプロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどを含む基質から構成されている。基質成分は乾燥重量の 1% 程度であるが水となじんで線維間の潤滑と靭帯・腱全体の粘弾性をもたらしている。乾燥重量の 75～85% はコラーゲンであるが靭帯の方が腱に比べてエラスチン量が多く、グリコサミノグリカンが少ない。また、治癒組織や成熟組織に多く観察され、負荷に応じて比較的早くその量を変化させるⅢ型コラーゲンはコラーゲンの全量に対して、腱で 5% 以下であるのに対し、靭帯では約 2 倍の 10% 程度を占めるという違いがある。その他はほとんどがⅠ型コラーゲンである。¹⁶⁾

運動などによって靭帯は損傷する。関節外部にある内側側副靭帯は保存療法が利用できるが、前十字靭帯は関節内部にあるため治癒能力は非常に低い。そのため、最近では前十字靭帯と同程度の強度を持つ、膝蓋腱・ハムストリング筋腱などの自己組織の移植などによって靭帯の再建が行われている。人工靭帯の開発も進められてきたが、材料の劣化や靭帯－骨接合部の強度不足などの問題があり完全な人工靭帯は開発されていない。

1-4-4 肺(Lung)

肺は胸郭の内腔の大部分を占める半円錐状の器官であり、成人の場合体積は4～5Lである。肺上部の先端部を肺尖といい、底面を肺底といい右肺と左肺よりなる。右肺は上葉・中葉・下葉、左肺は上葉・下葉に分かれている。¹⁷⁾ 左右の肺は肺胸膜に覆われた胸郭内部にある。胸腔圧が大気圧よりも低いため、肺は正常な状態では膨張している。肺は通常大きな変形と伸び、ひずみを受けていることが分かる。息を吸うときは胸郭を広げ横隔膜を下げて胸腔を大きくすると、胸腔圧がいつもより低下するため、肺は膨張し、空気が気道から入ってくる。息を吐くときは胸腔を小さくして胸腔圧を高め、肺を収縮させて空気を出す。肺の運動はこのように受動的である。¹⁸⁾

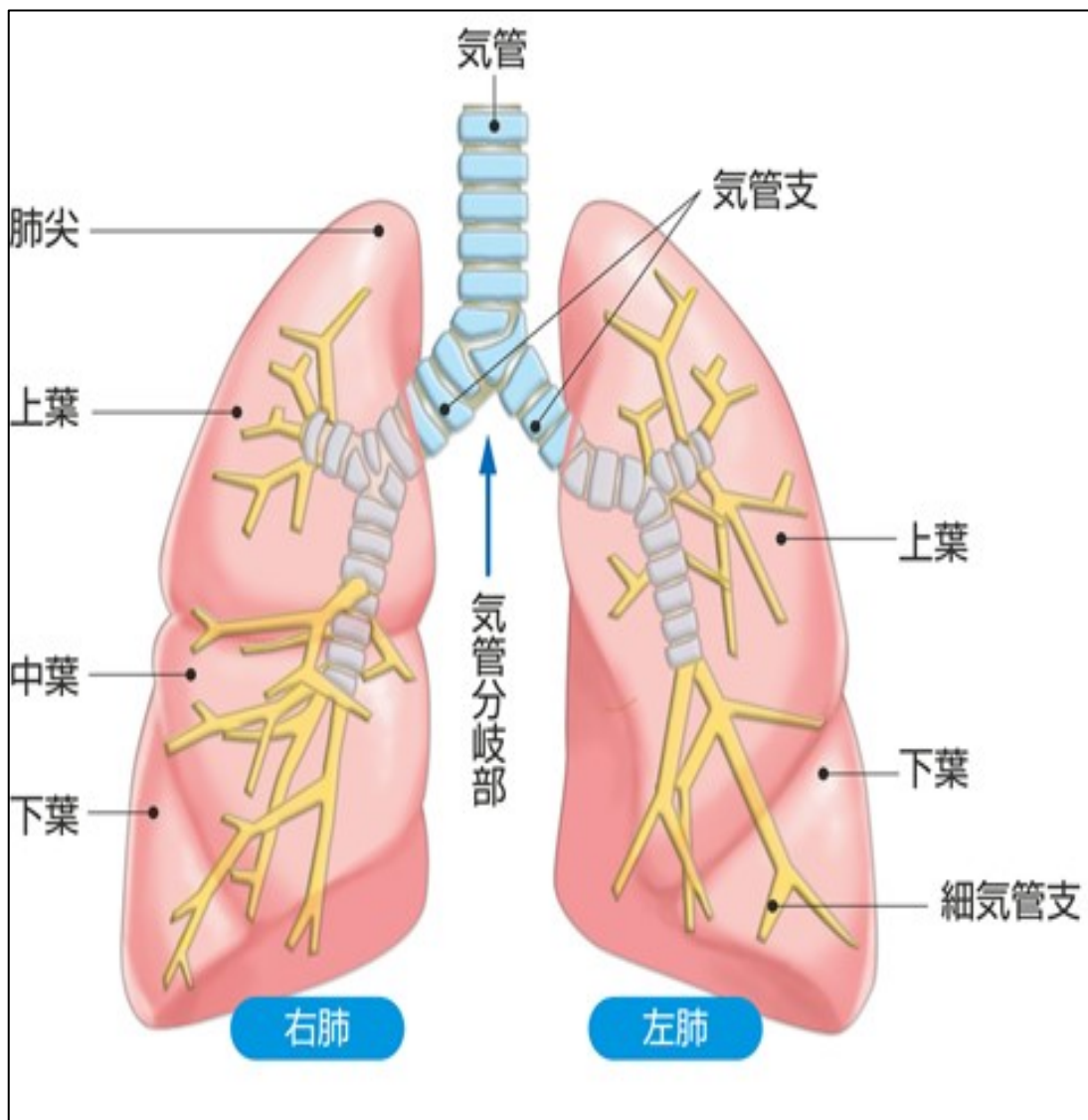


Fig.1-12 肺の構造¹⁹⁾

肺の主な機能は空気中の酸素と血液中の二酸化炭素のガス交換である。人間の場合、空気は気管、主気管支、葉気管支(内径約 7mm)、区域気管支、細気管支(内径約 1mm)、終末細気管支、呼吸細気管支(内径約 0.3mm)、肺胞管²⁰⁾と 23 回に分岐した軌道を伝わり、肺胞と呼ばれる最も基本的な肺の構成要素に達し、そこで酸素と二酸化炭素のガス交換が行われ、同じ気道を逆にたどって外に排出される。このように分岐を繰り返すことで断面積の総和が著しく増大し、気体の流れが遅くなり、ガス交換が容易になる。末梢にいくに従って気管支壁の軟骨は少なくなり、平滑筋や弾性線維が豊富になる。肺胞は 1 層の呼吸上皮細胞(肺胞上皮細胞)に囲まれた球状の小胞であり、内部の気体を肺胞気という。肺胞の直径は 200~300 μm で総数は約 3 億~4 億個、隣り合う肺胞が共有している壁(肺胞壁)の厚さは 5~10 μm であり、肺胞壁の表面積は 80~90 m^2 に達する。1 つの肺胞は多数の毛細血管を取り囲んでおり、肺胞気と毛細血管内の血液との間でガス交換が行われる。肺胞は弾性線維に富むが平滑筋を持たないため、自ら拡大縮小することはできない。呼吸運動に伴う胸腔内圧の変化によって受動的に進展度が増減する。

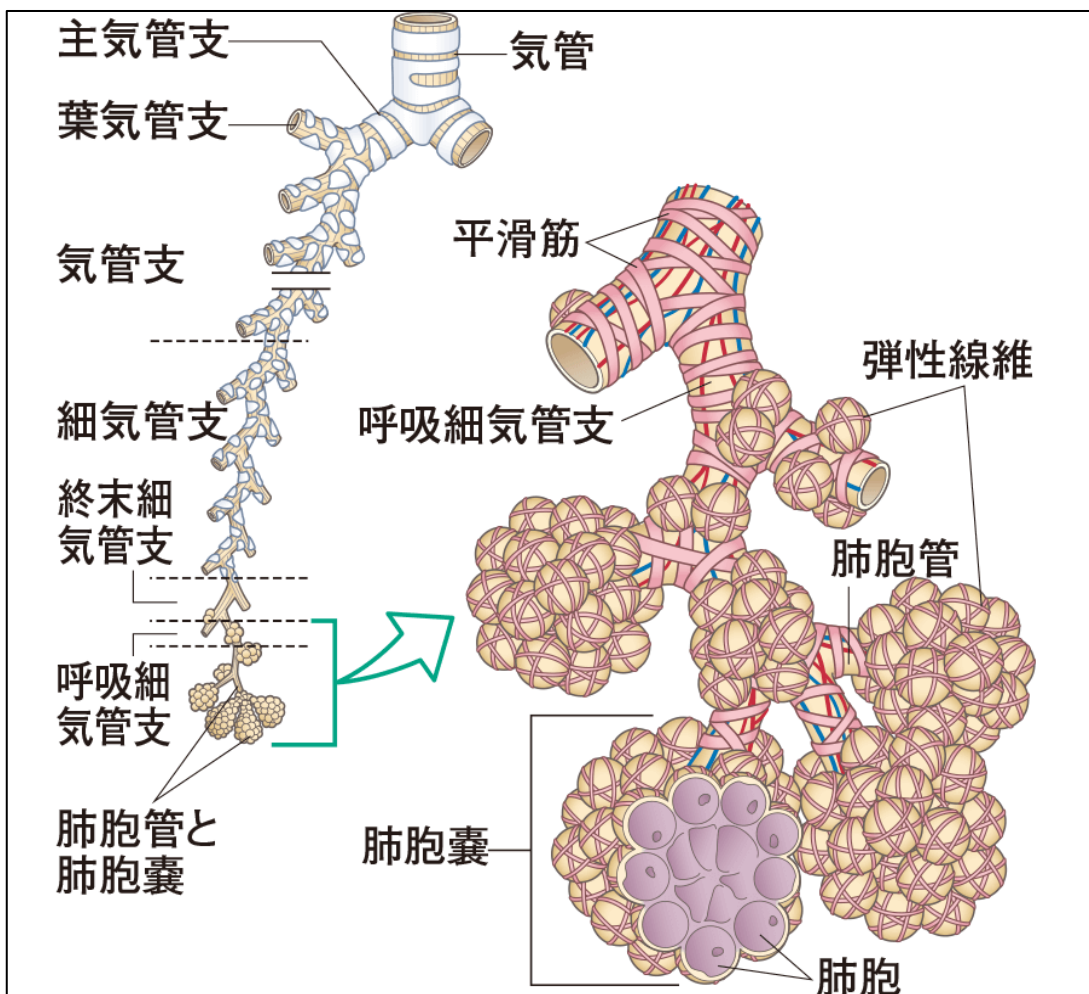


Fig.1-13 気管支と肺胞の構造²¹⁾

1-4-5 弾性軟骨(Elastic cartilage)

軟骨は血管や神経が存在しない組織である。軟骨細胞と細胞間を埋める軟骨基質から構成されている。軟骨には大きく 3 種類に分類される。主にⅡ型コラーゲンから構成され、人体で最も多い硝子軟骨、Ⅱ型コラーゲンに加えてⅠ型コラーゲンを含む線維軟骨、軟骨基質に弾性線維を多量に含む弾性軟骨に分類される。弾性軟骨は耳介や喉頭蓋などに存在し、基質中に縦横に交錯する膠原線維と多量の弾性線維があるため、弾性がある。

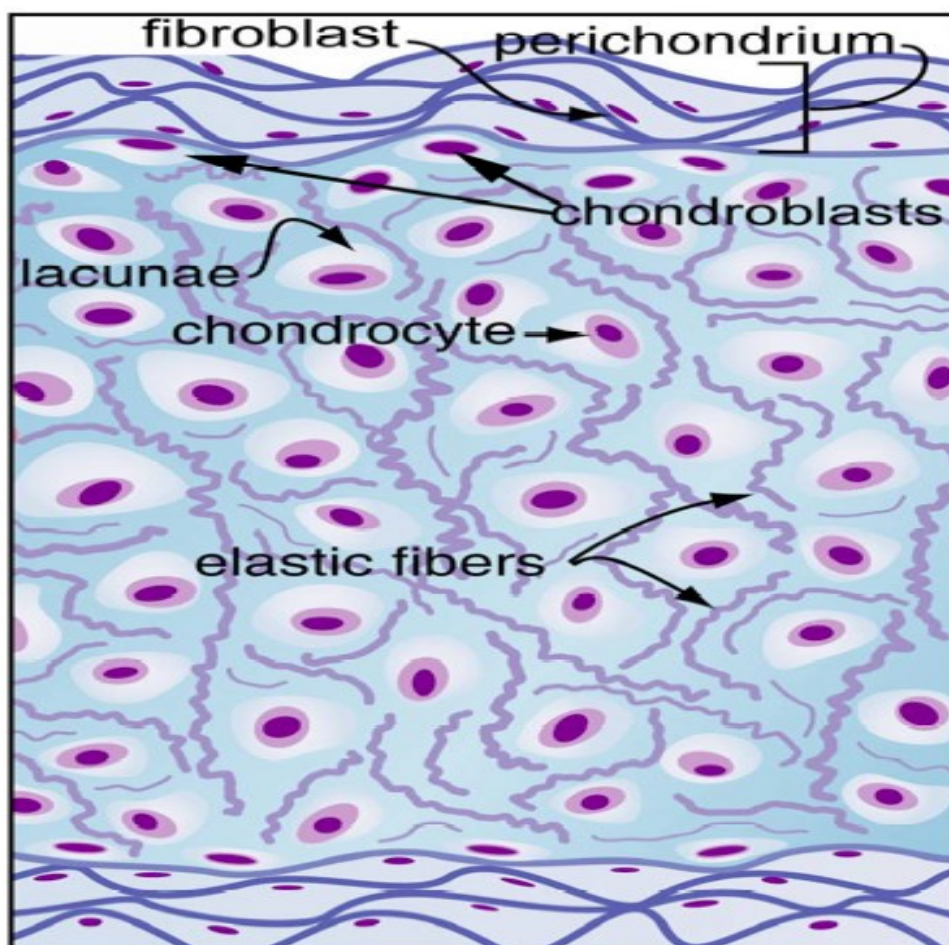


Fig.1-14 弾性軟骨の構造²²⁾

1-5 生体組織の力学特性

人体を構成している器官重量割合で約16%が骨などの硬組織であり、残りの84%は筋肉、皮膚、心臓、血管、腸などの軟組織である。¹⁸⁾ 生体軟組織を構成しているものとして骨格筋や平滑筋などの筋肉のほかにエラスチンやコラーゲンがあげられる。生体組織中のコラーゲン・エラスチンの重量割合はTable.1-1に示す。

Table.1-1 生体組織中のコラーゲン・エラスチンの重量割合¹⁸⁾

組織	コラーゲン(%)※	エラスチン(%)※
大動脈	23.1(B), 16.1(P), 25.6(R)	39.8(B), 57.1(P), 47.7(R)
頸骨	24.2(B)	
大腿骨	15.1(R)	
腱索	84.6(B), 76.9(P)	4.9(B), 3.7(P)
肝臓	2.0(B), 2.5(P), 0.6(R)	0(B), 0(P), 0(R)
腎皮質	5.3(B), 3.8(P), 3.3(R)	1.7(B), 0.6(P), 0.5(R)
筋肉	2.1(R, 肩), 5.8(R, 腹)	
左心室	1.9(B), 2.2(P)	0(B), 0(P)
右心室	3.8(B), 3.4(P)	0(B), 0(P)
脾臓	3.1(B), 2.4(P), 3.5(R)	4.6(B), 1.3(P), 0.6(R)
脳	0.2(R)	0(R)
肺	11.3(R)	4.8(R)
胃(噴門部)	23.6(R)	1.6(R)
皮膚	67.6(R), 64.3(D), 72.1(G), 71.9(H)	

※脱脂肪乾燥重量に対する割合

B:ウシ、P:ブタ、R:ラット、D:イヌ、H:ヒト

生体内の器官においてこれらの線維はゲル状の間質物質野中に埋もれており、個々の器官によってその密度、相互の配向などが異なっている。そのため、同じような構成要素によって構成されていたとしてもその割合、配向、結合様式の差などによって異なる力学的特性を持っている。

Table.1-2 一般的な材料の力学的性質¹⁸⁾

材料	弾性率(MPa)	引っ張り強度(MPa)
レジリン	1.8	3
アブダクチン	1~4	—
エラスチン	0.6	—
コラーゲン	1×10^3	$0.5 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^2$
骨	1×10^4	1×10^2
ゴム	1.4	—
オーク材	1×10^4	1×10^2
軟鋼	2×10^5	5×10^2

レジリン:ある種の昆虫の持つ弾性タンパク質

アブダクチン:2枚貝のちょうつがい部にある内靭帯を構成する弾性タンパク質

Table.1-2 のようにコラーゲンの方がエラスチンよりも弾性率は高い結果となっている。

力学的特性には受動的特性と能動的特性の2つに分けて考えることができる。受動的特性には流れや静的変形現象を扱う静的な特性と、振動現象などを扱う動的な特性がある。受動的力学特性には、応力とひずみの関係のように生体を素材としてみた時の基本的な力学特性があり、弾性と粘性の組み合わせであらわされる。生体組織および人工材料の力学特性はTable.1-3に示す。ある限界内の荷重で変形との間に線形性が認められ、ほぼ一定のヤング率が求まるが、過大な荷重ではヤング率が荷重とともに増大したり、組織や材料が破断したりする。²³⁾

Table.1-3 生体組織の力学的特性²³⁾(一部改変)

	最大荷重 (N/m ²)	最大変形 (%)	ヤング率 (MPa)
骨(圧縮)	1.5×10^8	2	0.8×10^4
腱(引っ張り)	0.8×10^8	8	1×10^4
動脈血管 (横方向引っ張り)	2×10^6	100	2
筋(引っ張り)	2×10^5	60	0.3
軟鉄	2×10^5	0.1	2×10^5
木材	1×10^8	1	1×10^4
プラスチック	0.5×10^8	5	1×10^3

生体組織の中でもコラーゲンを多く含む骨や腱の方がヤング率は高くなっているが、エラスチンを多く含む動脈血管では最大変形が高い値となっている。

Table.1-4 に生体の粘性を示すが、血液ではほぼ粘性のみであらわされるのに対し、固体的な軟組織や骨では共存する粘性と弾性のうち、粘性要素のみを取り出した数値である。このように、現実の物体は完全な弾性体でも完全な粘性体でもなく弾性体であっても粘性を、粘性体であっても弾性を兼ね備えている。このような物体を粘弾性体と呼び、大きく分けて液体的粘弾性と固体的粘弾性に分けられる。²³⁾

Table.1-4 生体組織の粘性 ²³⁾

	粘性 (cP)
水	0.67(37°C)
血液	1~6
軟組織	0.7×10^8
骨	$(3\sim4) \times 10^{10}$

また、生体組織を加熱処理し、コラーゲンを除去することで力学的強度は変化する。コラーゲンが存在すると弾性率は高くなり、コラーゲンが除去されると弾性率は低くなりエラスチンの効果によって、伸長率が高くなる組織もある。(Table.1-5)

Table.1-5 生体組織の弾性率 ^{24) 25)}

	コラーゲン処理	弾性率(kPa)	伸長率(%)
豚大動脈(大)	なし	177.7 ± 20.7	258 以上
	あり	90.3 ± 7.4	151 ± 74.2
豚大動脈(小)	なし	303.6 ± 86.5	151 以上
	あり	172.1 ± 27.9	146 ± 4.5
牛靱帯	なし	202.5 ± 71.2	135 以上
	あり	197 ± 18.9	159 以上
牛腱	なし	2776 ± 414.8	27 以上
	あり	16	172

1-6 細胞外マトリックス

臓器、器官あるいは組織は、個々の組織に特有の細胞と間質からなっており、間質は細胞外マトリックスと呼ばれるコラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカンなどが集まった不溶性の膠原線維・弾性線維・基底膜・液体成分から構成される。弾性線維は、膠原線維、基底膜とならんで結合組織の機能を帯びた細胞外マトリックス複合体である。この細胞外マトリックス複合体は血管・肺・靱帯・皮膚をはじめ、ありとあらゆる組織、臓器に分布し臓器・組織固有の形、強度、弾性の保持を行っている。⁷⁾

1-6-1 エラスチン(Elastin)

エラスチンは分子量約 67kDa で、細胞外マトリックスの一つであり体内では皮膚・血管・靭帯・肺などの弾性・伸縮を必要とする組織に存在している線維状タンパク質である。体内の組織中におけるエラスチン含有量は、靭帯で約 78~80%、動脈で約 50%、肺で約 20%、皮膚の真皮で約 5%を占めている。前駆体であるトロポエラスチンが凝集(コアセルベーション)し、互いに近接したトロポエラスチンのリシン残基同士が酵素リシルオキシダーゼの作用によって架橋される。この分子間の架橋結合によって、エラスチン特有のアミノ酸であるデスマシン・イソデスマシンが形成され不溶性のエラスチンとなる。また、特異的なアミノ酸配列として VGVAPG (Val バリン-Gly グリシン-Val バリン-Ala アラニン-Pro プロリン-Gly グリシン) 構造を有していることが知られ、この部分が細胞接着領域となっている。

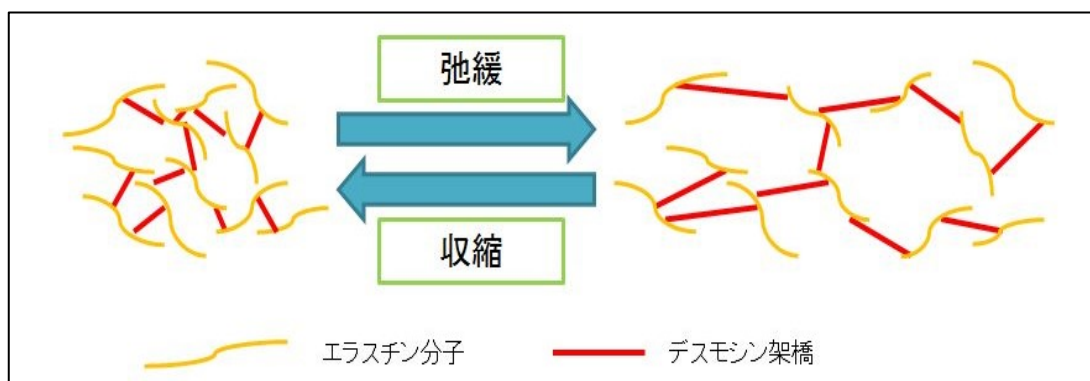


Fig.1-16 エラスチンの構造

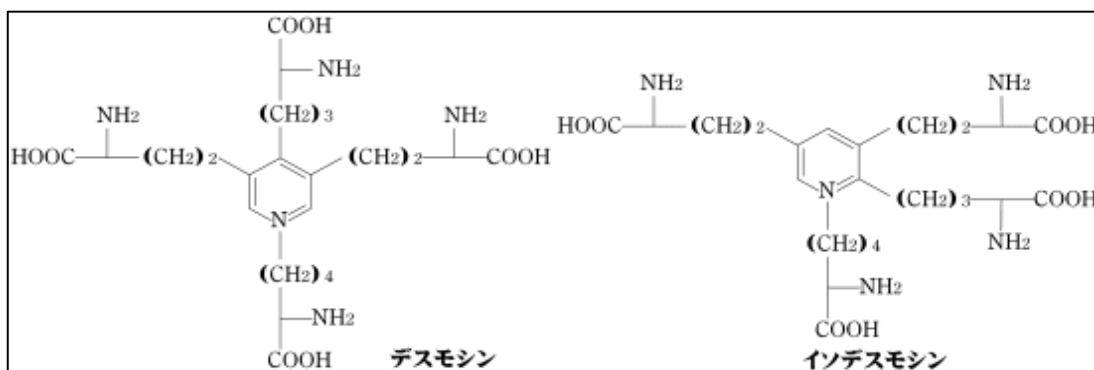


Fig.1-17 デスマシン・イソデスマシンの構造²⁶⁾

エラスチンの分子構造についてはいくつか提唱されているが、疎水性アミノ酸領域の繰り返し配列によるβ-らせん構造と架橋領域であるα-ヘリックス構造からなり、この領域でデスマシン・イソデスマシンの架橋構造を形成するという説が有力である。らせん構造と架橋構造が交互に組み合わさって全体として三次元的構造を形成し、らせん構造によって伸展性が発現し、架橋部分はエラスチンが伸展した状態から元に戻る力となり、全体として弾性を発現するとされている。

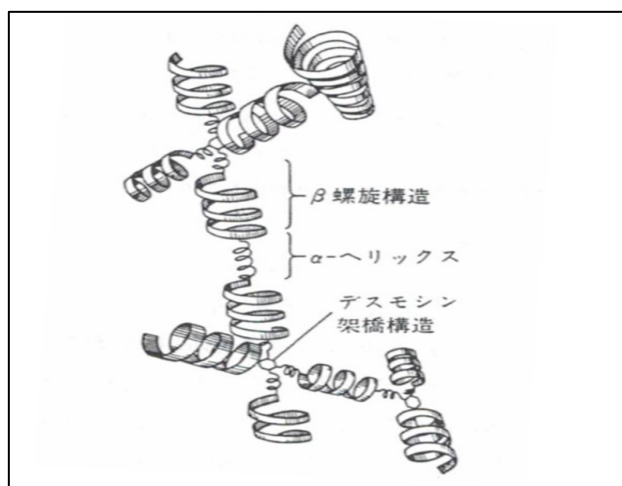


Fig.1-18 エラスチンの高次構造⁷⁾

また、エラスチンは加熱すると凝集し、冷却すると元に戻るという自己凝集機能であるコアセルベーション (Fig.1-19) という性質を持っている。コアセルベーションが起こるとエラスチンは白濁するため視覚的に確認することができる。

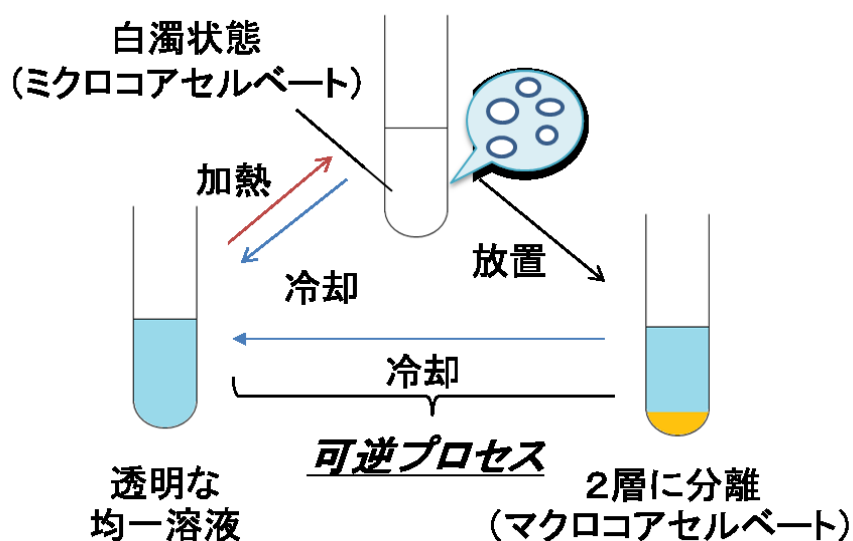


Fig.1-19 コアセルベーション²⁷⁾

エラスチンは酸やアルカリ処理によって可溶性にすることができる。酸で可溶性になった水溶性エラスチンはα-エラスチン、アルカリで可溶性になった水溶性エラスチンはκ-エラスチンと呼ばれている。水溶性エラスチンは不規則的に切断されているため弾性率や凝集温度、数平均分子量によって数種類のクラスに分画することができる。

1-6-2 フィブリリン(Fibrillin)

フィブリリンは分子量約 350kDa で、エラスチンと同様の細胞外マトリックスの一つであり、生体内で弾性系線維に存在している糖タンパク質である。システイン 2 残基で形成されるジスルフィド結合 (Fig.1-20) により不溶性の特徴を持つ。フィブリリンはこのジスルフィド結合に対して還元剤処理し切断することによって可溶性にすることができる。フィブリリンによって形成されるマイクロフィブリルと呼ばれる微細線維が生体内で形成される。マイクロフィブリルは弾性線維形成初期でトロポエラスチンが沈着するための足場となり、トロポエラスチンがエラスチンへと成熟するために機能する。

フィブリリンには数種類が存在し、現在はフィブリリン-1、-2、-3 が存在することが確認されている。その中でも特にフィブリリン-1、-2 が知られている。この 2 つは構造的には非常に似ていてアミノ酸の約 80%が相同しているが、フィブリリン-1 は N 末端にプロリンが富む部位を持つのに対して、フィブリリン-2 は N 末端にグリシンが富む部位を持つという相違点がある。

フィブリリン遺伝子の突然変異により遺伝子疾患が起こることが確認されている。第 15 染色体にあるフィブリリン-1 遺伝子の異常からマルファン症候群を引き起こす。マルファン症候群とは細胞と細胞をつなぐ結合組織が弱くなるため大動脈、目、肺、骨などの形成異常が起こる病気である。その中でも注意すべき点は大動脈に関してであり、大動脈の拡大、解離、破裂や大動脈弁および僧坊弁の閉鎖不全が引き起こされる危険があることである。

第 5 染色体にあるフィブリリン-2 遺伝子の異常から先天性拘縮性クモ指症候群を引き起こす。先天性拘縮性クモ指症候群はマルファン症候群と症状が類似している。手足が長細い体形で生まれたり、指、肘、膝などに屈曲拘縮が見られるといった特徴がある。

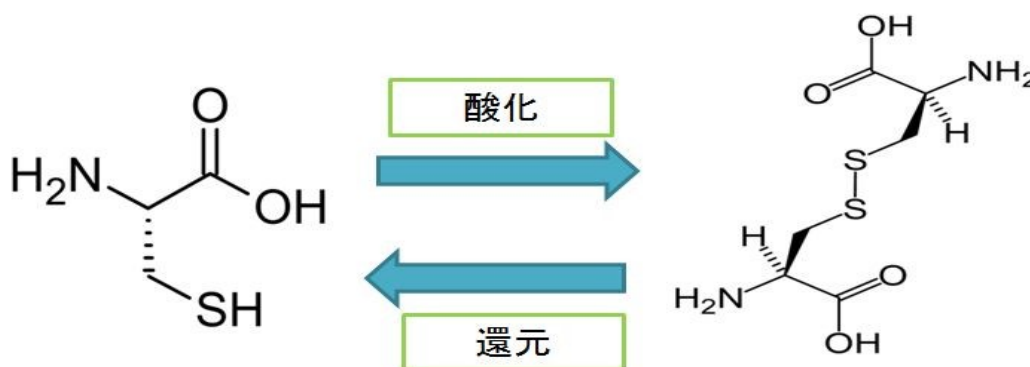


Fig.1-20 ジスルフィド結合

フィブリリン分子は N 末端から C 末端までの長さが 160nm である。しかし、分子は折りたたまれて存在し、この折りたたみ部位がビーズ状構造部に相当し、ビーズ状構造の周期は 56–100nm である。フィブリリンからなるマイクロフィブリルはビーズ状構造間の周期 56–100nm では可逆的に伸張・収縮できる。さらに引き延ばされると線維は変形し、元の状態には戻らない。また、この折りたたみ部分は TGF β 結合タンパク様ドメインとカルシウム結合性 EGF 様ドメイン間にあり、ビーズ状構造に観察される部位と考えられている。1 本のマイクロフィブリルは 6–8 本のフィブリリン分子からなることが観察されているが、ほかの線維形成どのように関与しているかについては不明である。しかし、フィブリリン 1 分子に 1 ビーズ状構造が存在し、フィブリリン-1 の N 末端と C 末端が隣接する所見、フィブリリン分子径は 2.2nm でマイクロフィブリル径は 10–12nm であることなどから分子の N 末端と C 末端が結合し、さらにそれらが平行に会合して線維形成されると推測されている。

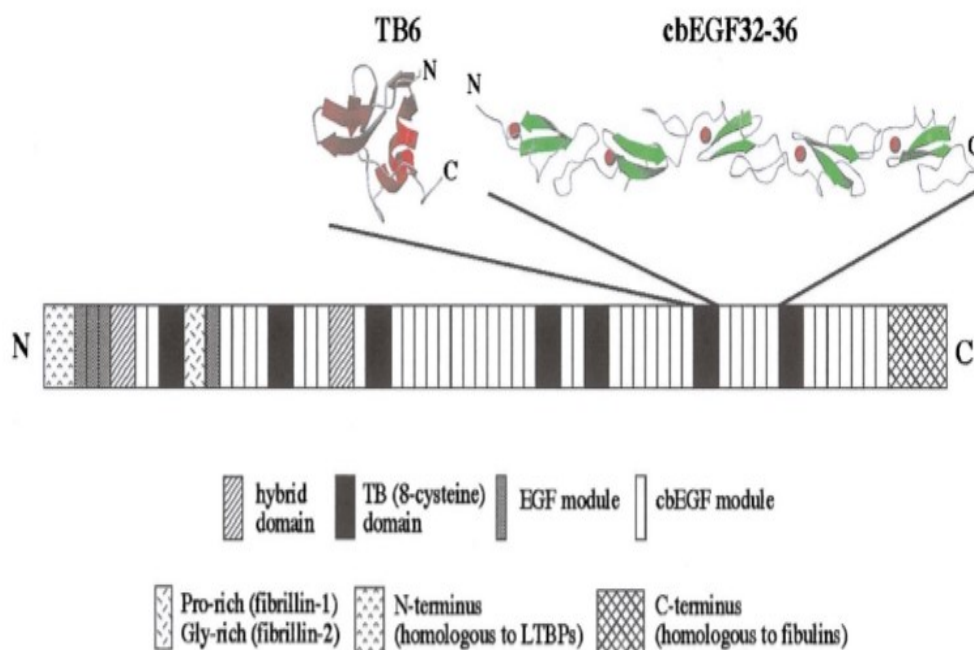


Fig.1-21 フィブリリン-1 のドメイン構造²⁸⁾

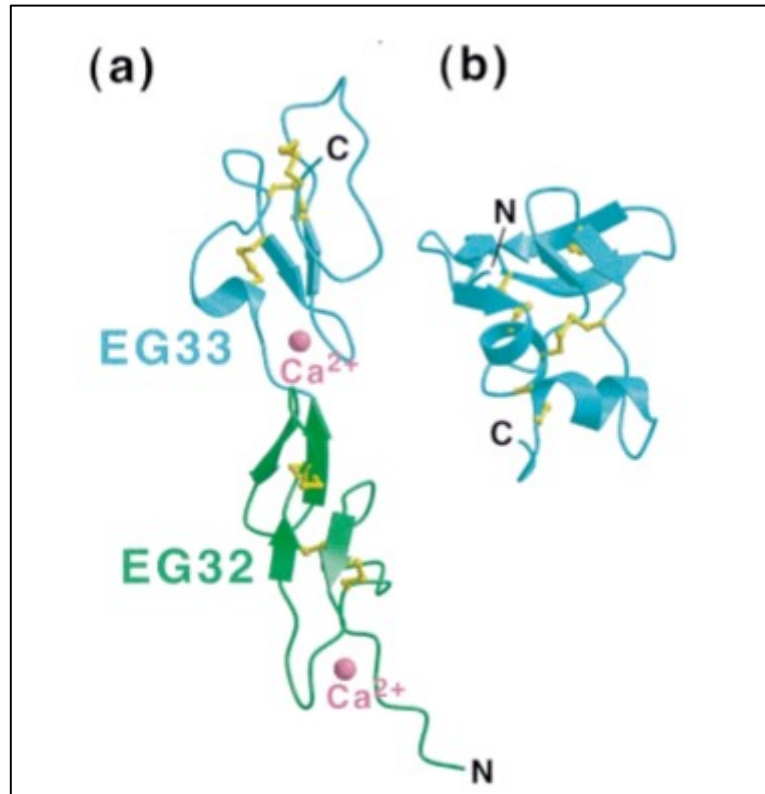


Fig1-22 フィブリリン-1のドメインの溶液構造²⁹⁾

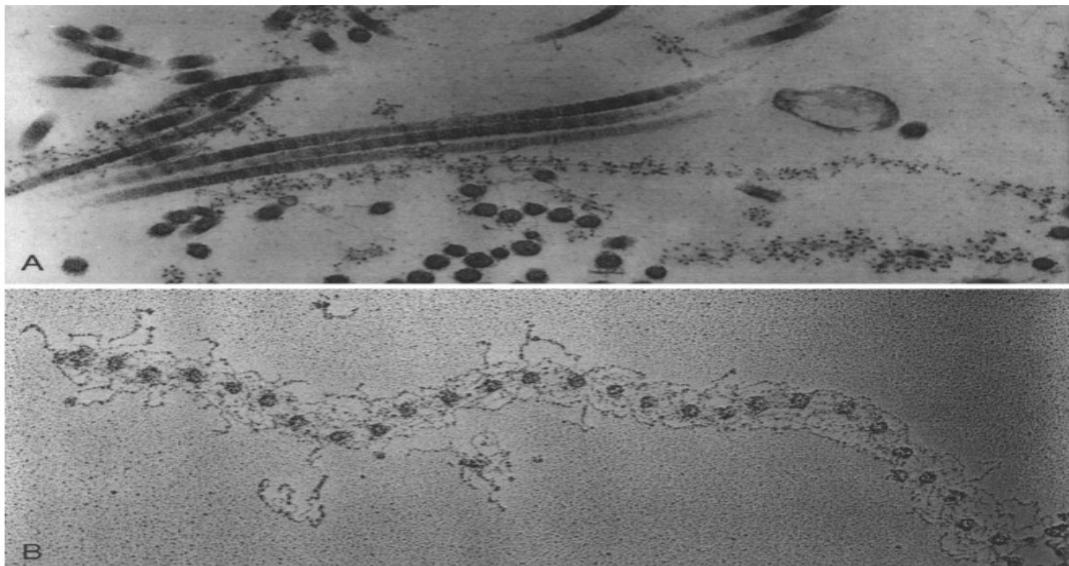


Fig.1-23 マイクロフィブリルの電子顕微鏡画像³⁰⁾

A: Fibrillin-1 抗体で標識されたマイクロフィブリルの電子顕微鏡画像

B: 組織から抽出したマイクロフィブリルの電子顕微鏡画像

1-6-3 コラーゲン(Collagen)

コラーゲンは生体の中で最も豊富に存在するタンパク質であり、特異な構造と会合体を持ち細胞外に存在する。コラーゲンは1分子当たり分子量が約300kDa、長さは約300nm、太さは約1.5nmである。全身のあらゆる臓器・組織に存在しており、特に皮膚や骨、軟骨、腱、血管壁、歯などの硬い組織に多く存在している。現在、29種類のコラーゲン型が存在している。コラーゲンは高い生体親和性を持ち、再生医療・組織工学用のバイオマテリアルとして多く利用されている。

コラーゲンは3本のポリペプチド鎖が3重らせん状構造をとる特徴的な構造をしている。コラーゲン分子の両端部分はテロペプチドになっており、ヘリックス構造を持たない。テロペプチドは抗原性を示すためバイオマテリアルとして使用する際にはペプシン処理によりテロペプチドを除去し、抗原性の低いアテロコラーゲンとして利用されている。また、コラーゲンの3重らせん構造は加熱すると壊れ、ゼラチン化する。コラーゲン分子は(Gly-X-Y)_nの繰り返しの1次構造からなり、これはコラーゲンの機能発現に密接に関連している。X部分にはPro、Yの部分にはHypが頻出していることが知られている。コラーゲンは細胞環境の形成、細胞活性の調節(とくに細胞の分化、増殖、細胞の形や移動を制御し)、がんの増殖抑制、神経の可塑性などにかかわっており、細胞社会の情報と環境の恒常性維持に極めて重要な機能を果たしている。¹²⁾

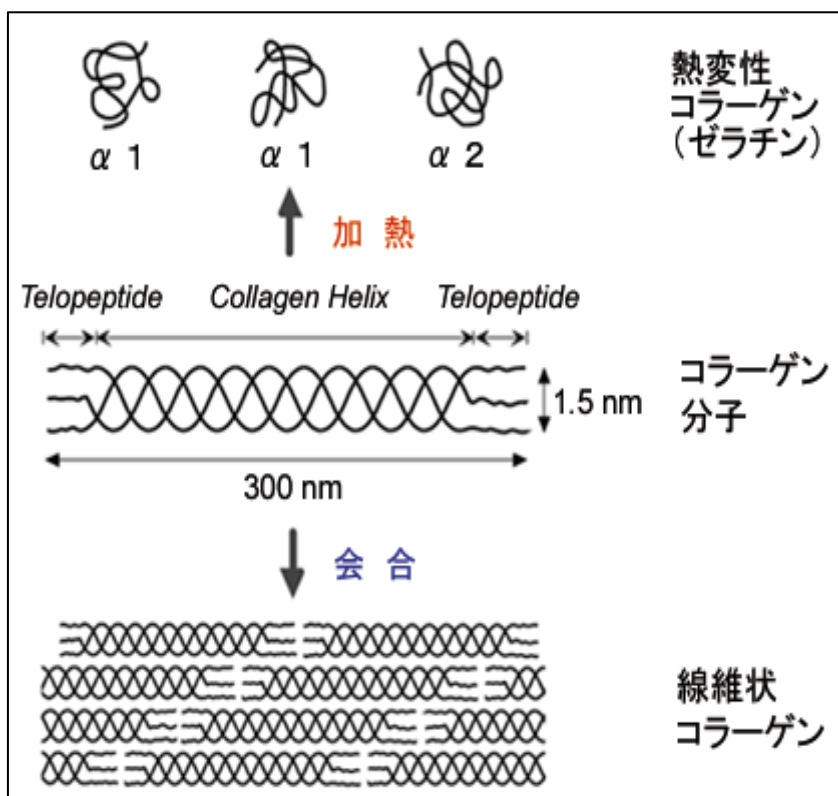


Fig1-24 コラーゲン分子およびコラーゲン線維³¹⁾

1-7 本研究の目的

当研究室では、以前からブタ大動脈に加水分解を行うことによって弾性線維組織の構成成分であるエラスチンを抽出してきた。このエラスチンを用いて組織工学における足場材料となるハイドロゲルを作製してきた。しかし、エラスチンは高い伸縮性を持つが力学的強度が低いという欠点がある。そこで、エラスチンと同じく弾性線維の構成成分の1つであるフィブリリンに注目し、この2つの細胞外マトリックスを複合させたゲルを作製することを目指している。以前の研究よりフィブリリンを複合させることでゲルの力学的強度が上昇するということが分かっている。²⁵⁾³²⁾³³⁾ また、材料に用いるフィブリリンの作製方法を見直し、作製したフィブリリンの特性を調査した。

組織工学には細胞を足場材料中で培養して体外で組織を作製し体内で組織の再生を誘導する生体外アプローチと、細胞と足場材料を組み合わせて生体内に埋植し生体内で組織の再生を誘導する生体内アプローチの2つがある。³⁴⁾ 本研究では後者に着目し、細胞を包埋したゲルを作製し、損傷部位に移植することによって弾性線維組織を再生しようと考えている。組織工学における3次元足場材料には生体適合性・高度な力学的強度・多孔質性などの性質が要求される。細胞を適当な場所に配置し、必要な栄養を提供し、期待どおりの組織が再生されること³⁵⁾が3次元足場材料の最も重要な役割である。本研究では以下の3項目をみたくElastin-Fibrillin Hybrid Gelの開発を目指した。

- ①様々な弾性線維組織に適するように力学的特性を制御できるゲル
- ②多孔質性のあるゲル
- ③細胞を包埋し、培養可能なゲル

2 章.方法

2-1 水溶性 Elastin の抽出

2-1-1 シュウ酸による水溶性 Elastin の抽出

ブタ大動脈より精製した不溶性弾性線維を 0.25M シュウ酸水溶液でシュウ酸処理し上澄み液を透析用セルロースチューブに入れ、透析外液の浸透圧が 0 mOsm、pH が 4.5 以上になるまで透析を行った。透析終了後、セルロースチューブから取り出した液を遠心分離し上澄み液を凍結乾燥し水溶性 Elastin を得た。

2-1-2 弾性率による水溶性 Elastin の分画

2-1-1 で抽出した水溶性 Elastin を用いて高温架橋 40% Elastin Gel を作製した。弾性率測定を行い、以下のようにクラス分けを行った。(Table.2-1)

Table.2-1 弾性率による水溶性 Elastin の分画

クラス	A	B	C	D	E
弾性率 (kPa)	50-	50-25	25-5	-5	ゲル化不可

2-1-3 凝集温度による水溶性 Elastin の分画

2-1-1 で抽出した水溶性 Elastin より 1% Elastin 水溶液を作製した。凝集温度測定を行い、以下のようにクラス分けを行った。(Table.2-2)

Table.2-2 凝集温度による水溶性 Elastin の分画

クラス	A	B	C	D	E
凝集温度 (°C)	-22.5	22.5-25	25-30	30-35	35-50

2-1-4 Elastin コーティングシャーレの接触角測定

浮遊培養シャーレに 1min コロナ放電を行った。コロナ放電後、0.1mg/ml の Elastin 水溶液を 1.5ml 添加し、シャーレ上にコーティングさせた。乾燥後、5 μ l の脱イオン水をコーティングシャーレ上に静かに置き、接触角測定器でコーティングシャーレの接触角を測定した。

2-2 水溶性 Fibrillin の抽出

2-2-1 2-メルカプトエタノールによる水溶性 Fibrillin の抽出

0.1M Tris-HCl (pH8.5、6M 尿素、0.05M 2-メルカプトエタノール、1% EDTA・2Na)を調整し、不溶性 Fibrillin とともに耐圧瓶に入れ 20min 脱気した。脱気後 N₂ を充填し 37°C、24h で攪拌した。攪拌後、遠心分離し上澄み液を透析用セルロースチューブに入れ透析を行った。透析終了後、セルロースチューブから取り出した液を遠心分離し上澄み液を 0.22μm セルロースフィルターを用いて吸引ろ過した。ろ液を凍結乾燥し水溶性 Fibrillin を得た。

2-2-2 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成分析

2-2-1 で抽出した水溶性 Fibrillin を北海道大学創成研究機構グローバルファシリティセンター機器分析受託部門に送り、アミノ酸組成分析を依頼した。

2-2-3 Elastin・Fibrillin の最適比率決定

アミノ酸組成分析の結果から、抽出した水溶性 Fibrillin の Elastin・Fibrillin の最適比率を決定した。以下のようにして求めた。

混合物質中の Elastin を X(%）、Fibrillin を 100-X(%)とする。

$$\frac{\text{Elastin 理論値} \times X + \text{Fibrillin 理論値} \times (100 - X)}{100} \quad \text{式①}$$

$$\sum \text{各アミノ酸} (\text{測定値} - \text{式①})^2 \quad \text{式②}$$

式①により算出された各アミノ酸における値と、アミノ酸組成分析により算出された各アミノ酸における値の差を求め、それらの合計が最も小さくなる混合比率を最小二乗法によって算出した。

2-2-4 Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE)

水溶性 Fibrillin 水溶液をサンプルとした。アクリルアミドゲル (ATTO) にサンプルとサンプルバッファーを 1:1 で混合したものを 15mA・定電圧で電気泳動を行った。スタンダードとして ExcelBand 3-color Broad Range Protein Marker (コスモ・バイオ) を使用した。電気泳動終了後、Flamingo gel stain によりゲルを染色した。染色後、蛍光投影機 (Anatech) によって検出した。

2-2-5 Western blot (WB)

SDS-PAGE 後、ゲルに含まれるタンパク質をブロッティング装置を用いて Poly Vinylidene DiFluoride(PVDF)膜に 52mA で 1h 転写した。転写後の膜は固定、洗浄を行い、一次抗体に anti-fibrillin-1 polyclonal antibody(Abcam)、二次抗体に HRP-Goat anti-Mouse IgG(H+L) (Abcam)を使用した。抗体処理後、ECL(Enhanced Chemi Luminescence) (GE lifescience)を添加し、ルミノイメージアナライザー(LAS-4000 mini EPUV, FUJIFILM)で検出した。

2-2-6 分光蛍光光度計による測定

F-2000 形分光蛍光光度計 (HITACHI) の未知試料の最適励起波長を測定するプリスキャンモードを用いて、水溶性 Fibrillin の最適励起波長を測定した。測定した最適励起波長によって、蛍光波長分布を測定した。また、水溶性 Elastin と比較を行った。

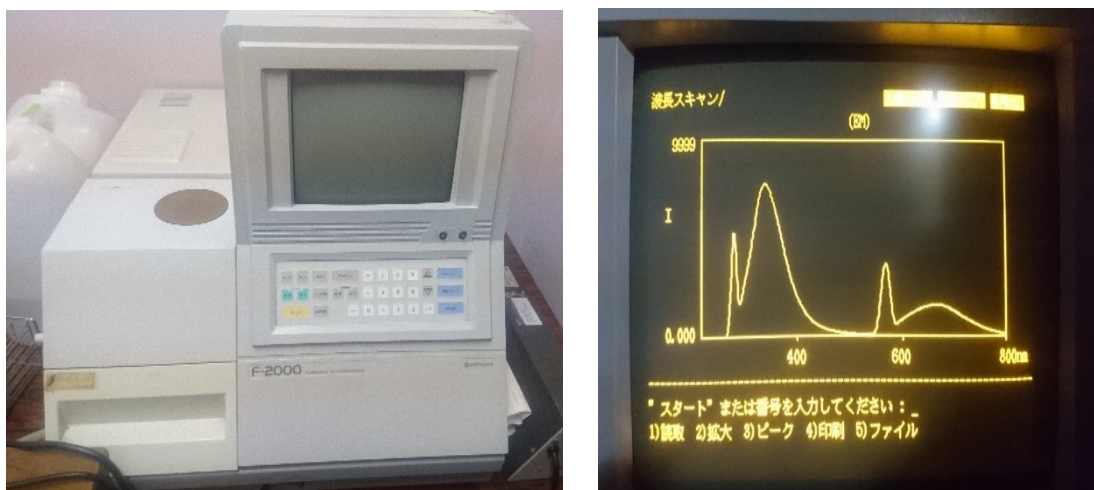


Fig.2-1 分光蛍光光度計

2-2-7 水溶性 Fibrillin Gel の作製

①高温架橋

水溶性 Fibrillin、Dode-DSP、脱イオン水を混合し遠心分離を行った。混合溶液を内径 1mm のキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて遠心分離を行った。ネジロ試験管を脱イオン水で満たし、70°Cの恒温槽で 30min 加熱した。その後、121°Cのオートクレーブで 1h 加熱しゲル化させた。Gel を取り出し、弾性率・伸長率測定を行った。

②低温架橋

水溶性 Fibrillin、Dode-DSP、Na₂CO₃aq、脱イオン水を混合し遠心分離を行った。混合溶液を内径 1mm のキャピラリーに詰め、栓をした後にネジ口試験管に入れて遠心分離を行った。ネジ口試験管を脱イオン水で満たし、37°Cでインキュベートした。Gel を取り出し、弾性率・伸長率測定を行った。

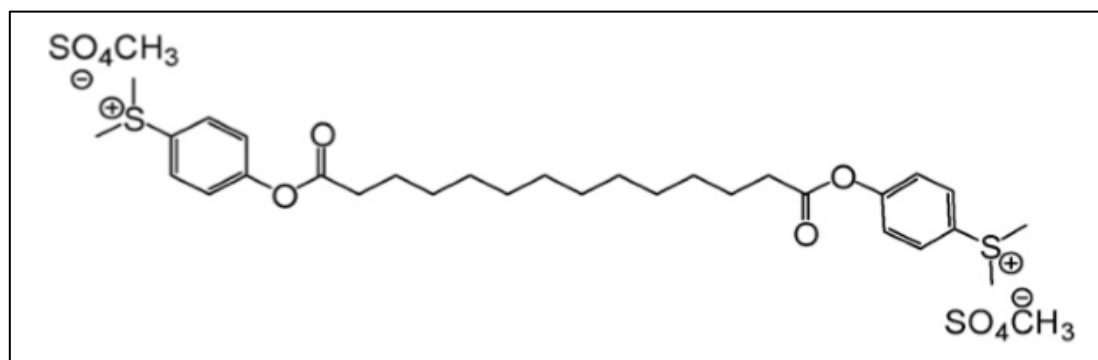


Fig.2-2 架橋剤 Dode-DSP の構造式³⁶⁾

2-2-8 水溶性 Fibrillin の凝集温度測定

2-2-1 で抽出した水溶性 Fibrillin より 1% Fibrillin 水溶液を作製した。凝集温度測定を行った。

2-2-9 Nuclear magnetic resonance (NMR)

L-Cystine、L-Cysteine、L-Aspartic acid 50mg を秤量しねじ口試験管に入れた。脱イオン水または 0.5M シュウ酸水溶液を 10ml 加え 100°Cで 6h 加熱した。加熱終了後、5M CaCl₂・2H₂O を 1ml 加え遠心分離した(3500rpm・5min)。上澄み液を -80°Cで凍結し凍結乾燥しサンプルを得た。サンプル 5mg を NMR サンプルチューブに入れ、さらに D₂O 500μl を加え栓をした。サンプルチューブを NMR 装置にセットし測定した。

Table.2-3 NMR で測定するサンプル実験群

No.	アミノ酸	溶媒
1	L-Cystine	0.5M シュウ酸水溶液(加熱なし)
2	L-Cystine	脱イオン水
3	L-Cystine	0.5M シュウ酸水溶液
4	L-Cysteine	脱イオン水
5	L-Cysteine	0.5M シュウ酸水溶液
6	L-Aspartic acid	脱イオン水
7	L-Aspartic acid	0.5M シュウ酸水溶液

2-2-10 Fibrillin コーティングシャーレの接触角測定

浮遊培養シャーレに 1min コロナ放電を行った。コロナ放電後、0.1mg/ml の Fibrillin 水溶液を 1.5ml 添加し、シャーレ上にコーティングさせた。乾燥後、5 μ l の脱イオン水をコーティングシャーレ上に静かに置き、接触角測定器でコーティングシャーレの接触角を測定した。

2-2-11 水溶性 Fibrillin の粘度測定

1%, 5%, 10% Fibrillin 水溶液を作製後、コーン/プレート型粘度計 DV-II +Pro (BROOKFIELD) のサンプルカップに 500 μ l 添加した。粘度計の回転数を 100、150、200rpm に設定し、10 $^{\circ}$ Cにおける粘度を測定した。

2-2-12 水溶性 Fibrillin のクロマトグラフィー

作製した水溶性 Fibrillin (10mg/ml) を PBS(0.1M NaCl を含む) に溶解し、インジェクターに 100 μ l 注入して、ゲル濾過クロマトグラフィー用のカラム (TGK-G4000SW) に流した (流速: 1ml/ min)。UV 280、RI で検出し水溶性 Fibrillin の分子量を測定した。分子量マーカーとして BSA を測定した。

2-2-13 Rhodamine B isothiocyanate(RBITC)ラベル化 Fibrillin の作製

0.1% Rhodamine B isothiocyanate mixed isomers (SIGMA-ALDRICH) 水溶液を作製し、水溶性 Fibrillin を溶かした。暗室で約 3 時間静置した後、透析チューブに入れ冷蔵庫内で (4 $^{\circ}$ C) 遮光にて透析を行った。1 週間透析を行った後、透析チューブから溶液を取り出し、遮光にて凍結乾燥を行い、Rhodamine B isothiocyanate ラベル化 Fibrillin を得た。

2-3 高温架橋による Elastin Gel の作製 (A Gel)

ElastinA、Dode-DSP、脱イオン水を混合し遠心分離を行った。混合溶液を内径 1mm のキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて遠心分離を行った。ネジロ試験管を脱イオン水で満たし、70°Cの恒温槽で 30min 加熱した。その後、121°Cのオートクレーブで 1h 加熱しゲル化させた。Gel を取り出し、弾性率・伸長率測定を行った。

2-4 低温架橋による Elastin Gel の作製 (A Gel)

ElastinA、Dode-DSP、Na₂CO₃aq、脱イオン水を混合し遠心分離を行った。混合溶液を内径 1mm のキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて遠心分離を行った。ネジロ試験管を脱イオン水で満たし、37°Cでインキュベートした。Gel を取り出し、弾性率・伸長率測定・ゲル化時間測定及び構造観察を行った。

2-5 貫通孔を持つ Elastin Gel の作製 (AE Gel)

ElastinA、ElastinE、Dode-DSP、Na₂CO₃aq、脱イオン水を混合し遠心分離を行った。混合溶液を内径 1mm のキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて遠心分離を行った。ネジロ試験管を脱イオン水で満たし、37°Cでインキュベートした。Gel を取り出し、弾性率・伸長率測定及び構造観察を行った。

2-6 高温架橋による Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製 (AX Gel)

ElastinA、Fibrillin-X、Dode-DSP、脱イオン水を混合し遠心分離を行った。混合溶液を内径 1mm のキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて遠心分離を行った。ネジロ試験管を脱イオン水で満たし、70°Cの恒温槽で 30min 加熱した。その後、121°Cのオートクレーブで 1h 加熱しゲル化させた。Gel を取り出し、弾性率・伸長率測定を行った。

2-7 低温架橋による Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製 (AX Gel)

ElastinA、Fibrillin-X、Dode-DSP、Na₂CO₃aq、脱イオン水を混合し遠心分離を行った。混合溶液を内径 1mm のキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて遠心分離を行った。ネジロ試験管を脱イオン水で満たし、37°Cでインキュベートした。Gel を取り出し、弾性率・伸長率測定を行った。

2-8 貫通孔を持つ Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製 (AEX Gel)

ElastinA、ElastinE、Fibrillin-X、Dode-DSP、Na₂CO₃aq、脱イオン水を混合し遠心分離を行った。混合溶液を内径 1mm のキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて遠心分離を行った。ネジロ試験管を脱イオン水で満たし、37°C でインキュベートした。Gel を取り出し、弾性率・伸長率測定及び構造観察を行った。

2-9 作製した Gel の評価方法

2-9-1 力学的強度測定(弾性率・伸長率測定)

Gel の両端にスペーサーを付け、弾性率測定器で挟み固定した。Gel が常に脱イオン水(37°C)に浸るようにし、測定前の Gel に力がかからないよう調整し、その時のスペーサー間の Gel の長さを自然長とした。Gel を 1 秒間に 0.5mm ずつリニアアクチュエーターで引っ張り、その際、動歪み計測器に表示される張力をアナログ計測計算機に読み取らせた。Gel が破断するまで測定を続け、計測値から応力と歪を計算し、弾性率を求めた。また、自然長と破断時の Gel 長から伸びを求め、そこから伸長率を以下の式より求めた。

$$\text{破断時の伸び(m)} / \text{自然長(m)} \times 100 = \text{伸長率(\%)}$$

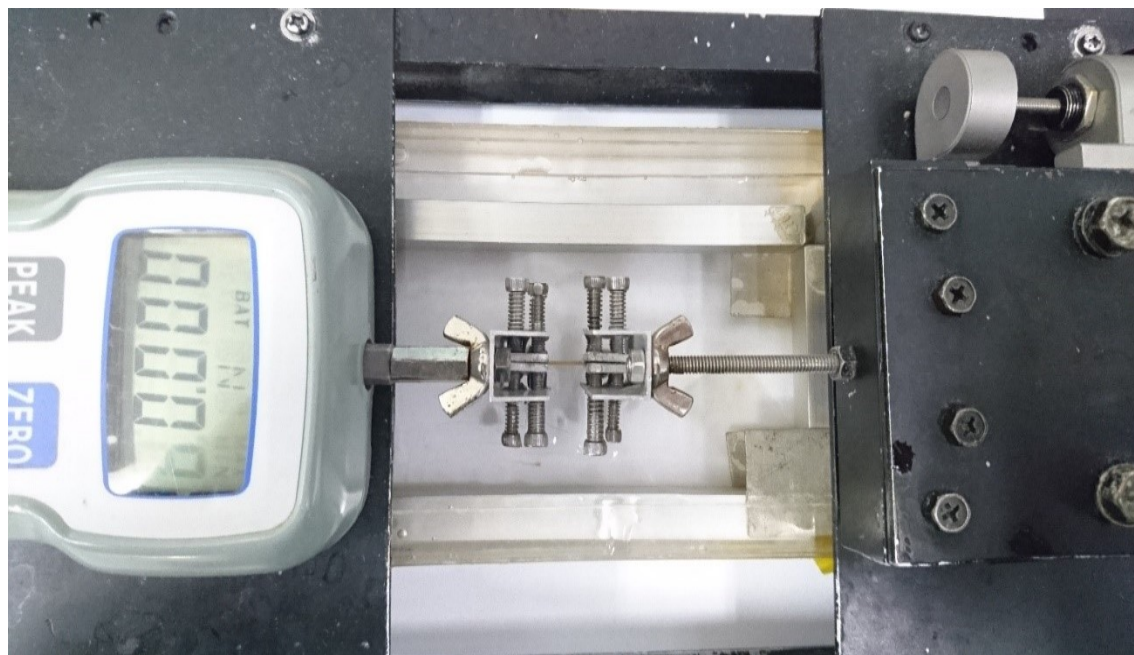


Fig.2-3 弾性率測定器

2-9-2 ゲル化時間測定

Elastin、Fibrillin、Dode-DSP、 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{aq}$ 、脱イオン水を混合し、プレゲル溶液を作製した。プレゲル溶液を内径 2.0mm のキャピラリーに吸い込み鉄球を入れ密封した。(Fig.2-4) 常に脱イオン水(37°C)に浸るようにし、ゲル化時間測定器にキャピラリーを挟み固定した。1秒間に0.1mm ずつリニアアクチュエーターで引っ張り、その際、動・歪み計測器に表示される力をアナログ計測計算機に読み取らせた。(10min 毎)計測値から散布図を作成し、peak と bottom の差を計算した。10min 毎の値を集計しゲル化時間を求めた。



Fig.2-4 ゲル化時間測定用キャピラリーチューブ

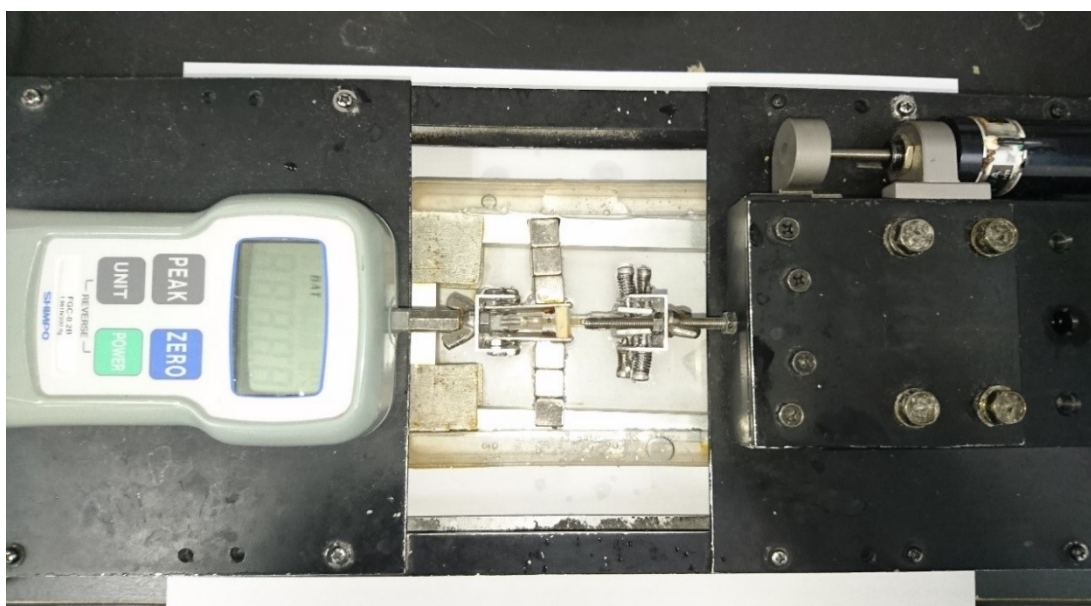


Fig.2-5 ゲル化時間測定器

2-9-3 走査型電子顕微鏡(SEM)による構造観察

サンプルは作製した Gel をゲル化後脱イオン水で1day 洗浄し脱水したもの、洗浄なしで脱水したものの2パターンを作製した。Gel の脱水方法は次のように行った。サンプルの Gel を 0.1% PBS に 10min 浸し、エタノール溶液(50%、70%、80%、90%、95%、99%)の濃度が低い方から順番に 10min ずつ浸し Gel の脱水を行った。次に、t-BuOH 溶液(50%)に Gel を浸し 15min 静置した。その後、t-BuOH 溶液(100%)に Gel を浸し 30min 静置を2回行った後、十分に凍結し凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、イオン Sputter で金コーティングし SEM で Gel の構造を観察した。

2-9-4 共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)による構造観察

共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss LSM710)を用いて、作製したゲルの構造を撮影した。作製したゲルをメスで薄く切り脱イオン水で満ちた成形容器に静置した。成形容器を共焦点レーザー顕微鏡のステージにセットした。(Fig.2-6) 抗体や蛍光色素は用いず、Elastin・Fibrillin の自家蛍光によって観察した。撮影条件をTable.2-4 に示す。

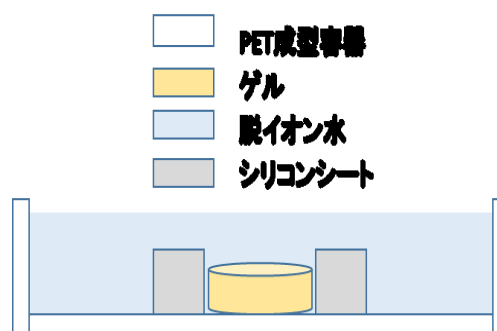


Fig.2-6 共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)と撮影方法

Table.2-4 Elastin と Fibrillin の撮影条件

	Elastin	Fibrillin
レーザー	Argon488	Diode405
蛍光波長範囲	493-634	406-634

2-9-5 動物実験による Elastin Gel の生体適合性の確認

Elastin Gel の生体適合性を確認するためウサギを用いて実験を行った。Gel に用いる試薬は全て滅菌したものを使い、以下の条件で 24well プレート内に厚さ約 1.5mm の Gel を作製した。(Table.2-5) 実験は三重大学医学部 整形外科との共同で行った。

Table. 2-5 ウサギ埋め込み Gel の作製条件

ElastinA(mg)	48
Milli-Q(μ l)	41.96
Dode-DSP(μ l) (348.7mM)	18.52
Na ₂ CO ₃ aq(μ l) (500mM)	11.52

以上のように作製した Elastin Gel を 3 羽のジャパニーズホワイトラビット(メス、12 週)の背中皮下部位に埋め込み縫合した。オペ後、1週間と6週間後に背中の状態を確認した。

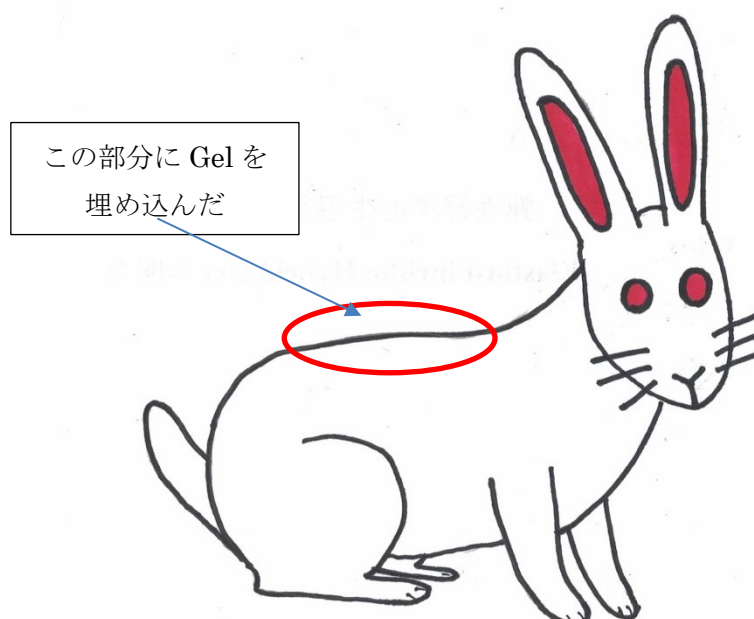


Fig.2-7 Elastin Gel 包埋箇所

2-10 細胞培養

ヒト胎児皮膚線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblasts) (ロンザジャパン)を、5000cells/cm² で播種し、10%FBS/DMEM の培地を用いて培養し、10%Trypsin/PBS を使用して継代した。継代は sub-confluent(70~80%)まで増殖した際に行い、はじめに播種した代を Passage1(P=1)として定義した。培養条件は 37°C/5% CO₂ でインキュベート、3 日に 1 回培地交換を行った。細胞数のカウントはトリプシン処理にて細胞を剥離させ、細胞懸濁液を調整した。血球計算板にカバーガラスをのせ、その隙間に培養フラスコに播種する直前の細胞懸濁液 7 μ lを注入して、顕微鏡で細胞数を測定した。

2-11 細胞毒性試験

Elastin Gel を作製する際に使用する架橋剤 Dode-DSP、架橋後に分解し析出する DSP の細胞に対する毒性を調査した。ヒト皮膚線維芽細胞を培養し、濃度の異なる Dode-DSP 添加 DMEM、DSP 添加 DMEM を加え、数日間培養した。培養後、トリパンブルー染色を行い、毒性を評価した。

2-12 2次元培養後の Real-Time PCR による遺伝子発現解析

培養したヒト皮膚線維芽細胞が産生した基質の評価として Real-Time PCR を行なった。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(東洋紡)、Forward プライマー、Reverse プライマー、RNA 抽出物、DEPC 水を混合し反応液を調整した。Real-Time PCR は三重大学生命科学研究支援センター遺伝子実験施設の StepOnePlus を使用して各サンプルの遺伝子発現解析を行なった。用いたプライマーは Table.2-6 に示す。

Table.2-6 Real-Time PCR プライマー

遺伝子名	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Ref.
GAPDH	GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA	GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T	37)
Elastin	CCT CCA CCC CTC TCG GCC TG	CAG CGC TGG ATAAAA GAC TCC TCC A	38)
Fibrillin-1	CTG CCC ACC TGA TTT TGA ACT G	CCA GAG CGG GTA TCA ACA CAG	39)
Collagen I	AAG GGA CAC AGA GGT TTC AG	TAG CAC CAT CAT TTC CAC GA	40)
Lysyl Oxidase	CTC TGA CGA CAA CCC TTA TTA CAA C	CTG GGA GAC CGT ACT GGA AGT	39)
α SMA	GAT CAC CAT CGG GAA TGA ACG C	CTT AGA AGC ATT TGC GGT GGA C	38)

2-13 Hydro Gel 内での細胞の3次元培養

2-13-1 Hydro Gel での細胞培養

ElastinA、ElastinE、Fibrillin-X、Dode-DSP、Na₂CO₃aq、DMEM を混合し遠心分離を行った。混合液の中に細胞懸濁液を加えゲル化させることによって、細胞包埋 Hydro Gel を作製した。10% FBS/DMEM を加え、37°C・5% CO₂ 条件下でインキュベートし培養した。

2-13-2 PicoGreen Assay による細胞増殖試験

Gel 内で 3 次元培養した細胞の増殖を測定するために PicoGreen Assay を行った。3 次元培養した Gel の培地を吸い取り、400U/ml エラスターゼ/PBS (pH=8.8)を 200 μ l 加え Elastin Gel を分解した。Gel の分解後、遠心分離を行い、上澄みと沈殿に分けた。上澄みと沈殿に 5% Triron-X/PBS を 300 μ l 加えた後、超音波処理を 20 分間行った。次に 15000 rpm、4 $^{\circ}$ Cにて 30 分間遠心を行った。また、Gel 分解後の上澄みにはトリクロロ酢酸 200mg を加え 15000rpm、15min 遠心分離を行いタンパクを沈殿させた。それぞれの操作により回収した上澄みと PicoGreen 溶液を混ぜ、蛍光強度の測定を行った(励起:499 nm、蛍光:527 nm)。細胞数は作成した検量線をもとにして計算を行い算出した。

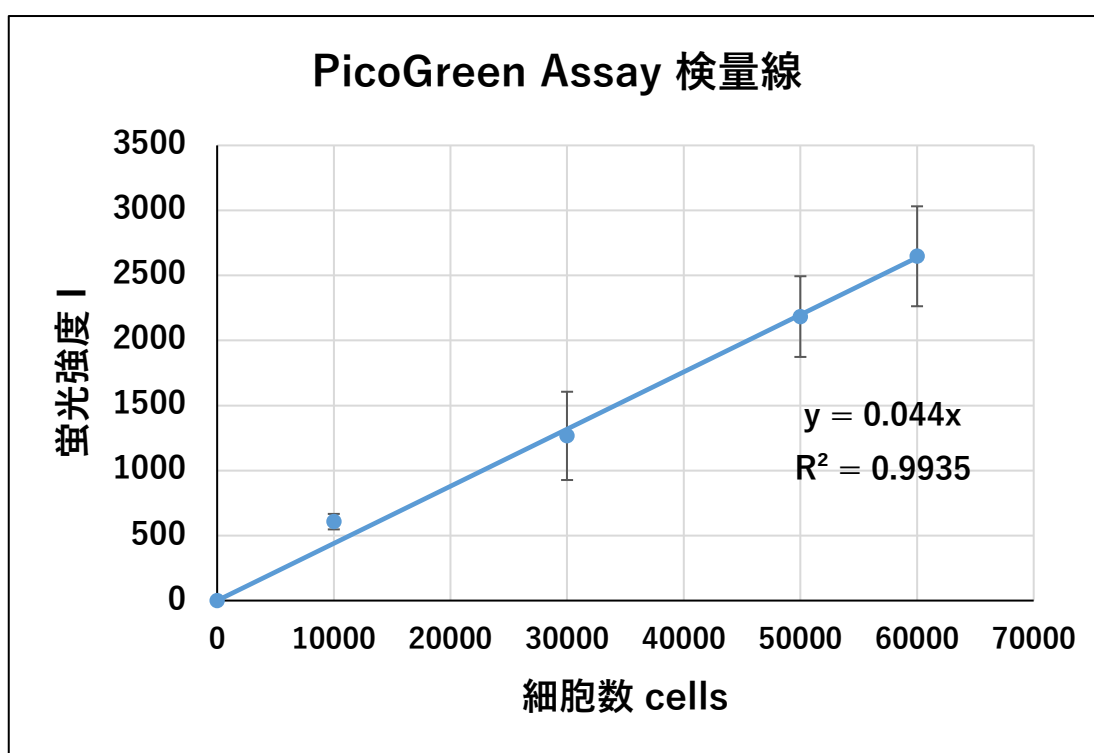


Fig.2-7 PicoGreen Assay 検量線 (ヒト皮膚線維芽細胞)

2-13-3 3 次元培養後の Real-Time PCR による遺伝子発現解析

Hydro Gel 内に包埋して培養を行なったヒト皮膚線維芽細胞が産生した基質の評価として Real-Time PCR を行なった。培養後のゲルを液体窒素で凍結し、乳鉢で粉砕した。粉砕したサンプルをアシストチューブに移し、RNA を抽出した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(東洋紡)、Forward プライマー、Reverse プライマー、RNA 抽出物、DEPC 水を混合し反応液を調整した。Real-time PCR は三重大学生命科学研究支援センター遺伝子実験施設の Step One Plus を使用して各サンプルの遺伝子発現解析を行なった。

2-13-4 免疫蛍光染色

3次元培養を行った後の細胞包埋Gelの培地を抜き取り、固定液を加え 15min 静置した。静置後固定液を抜き取り、染色用 PBS で 3×5min 洗浄を行なった。200倍希釈した PI を添加し、冷蔵庫(4℃)で Overnight させた。PI 溶液を抜き取り、染色用 PBS で洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

2-13-5 蛍光顕微鏡による細胞包埋 Gel の観察

3次元培養を行った細胞包埋 Gel を蛍光顕微鏡(KEYENCE/BZ-X700)で観察した。Elastin は自家蛍光、細胞核は PI によって核染色を行うことで観察し、3次元画像を撮影した。

2-14 統計処理

結果は解析ソフト(StatView-J 5.0)を使用し、Turkey-Kramer 法にて統計的有意差検定を行った。p 値<0.05 で統計的な有意差ありとした。有意差ありと判定した結果のグラフには、*:p<0.05、**p<0.01 と表記した。

3 章.結果

3-1 水溶性 Elastin の抽出

シュウ酸水溶液を用いて水溶性 Elastin を抽出した。(Table.3-1-1)

Table.3-1-1 水溶性 Elastin の抽出結果

不溶性弾性線維(g)	水溶性 Elastin (g)	収率(%)
422.5275	62.6484	14.8271

水溶性 Elastin の収率は約 14.8%であった。各加熱回数ごとの水溶性 Elastin の収量(g)は以下の通りである。(Table.3-1-2)

Table.3-1-2 各加熱回数ごとの水溶性 Elastin の収量

サンプル No	収量(g)	収率(%)
PE41-1	2.7622	0.6537
PE41-2	1.1851	0.2805
PE41-3	0.6041	0.1428
PE41-4	1.1876	0.2811
PE41-5	1.4538	0.3441
PE41-6	3.1152	0.7373
PE41-7	3.6913	0.8736
PE41-8	7.4924	1.7732
PE41-9	7.0843	1.6766
PE41-10	7.6471	1.8098
PE41-11	9.8192	2.3239
PE41-12	16.6061	3.9302

3-2 水溶性 Fibrillin の抽出

2-メルカプトエタノールを用いて不溶性 Fibrillin に還元処理を行い、水溶性 Fibrillin を抽出した。(Table.3-2-1)

Table.3-2-1 水溶性 Fibrillin の抽出結果

サンプル No	不溶性 Fibrillin (g)	水溶性 Fibrillin (g)	収率 (%)
FBN-411	2.8	0.7501	26.789
FBN-412	4.8	1.2642	26.3375
FBN-413	6.2	1.0643	17.166
FBN-414	11	1.8542	16.856
FBN-415	5.8	0.7641	13.174
FBN-416	4.2	0.9497	22.612
FBN-417	2.4	0.4911	20.4625
FBN-418	1.25	0.3249	25.992
FBN-419	1.4	0.4280	30.571
FBN-4110	2.8	0.5617	20.061
FBN-4111	9.9	0.7240	7.313
FBN-4112	12.5	1.4295	11.436

3-3 水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画

3-3-1 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成分析

北海道大学グローバルファシリティセンターに依頼した水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成分析の結果は Fig.3-3-1~12 のようになった。(Cys=Cystine+CysO₃OH)

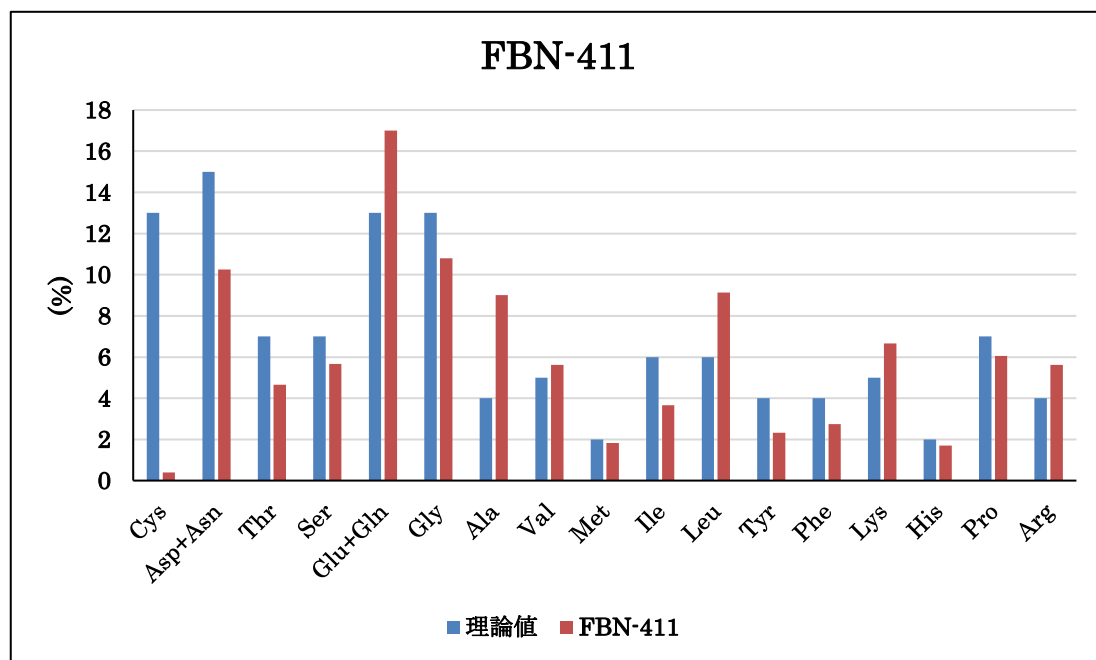


Fig.3-3-1 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成(サンプル No=FBN-411)

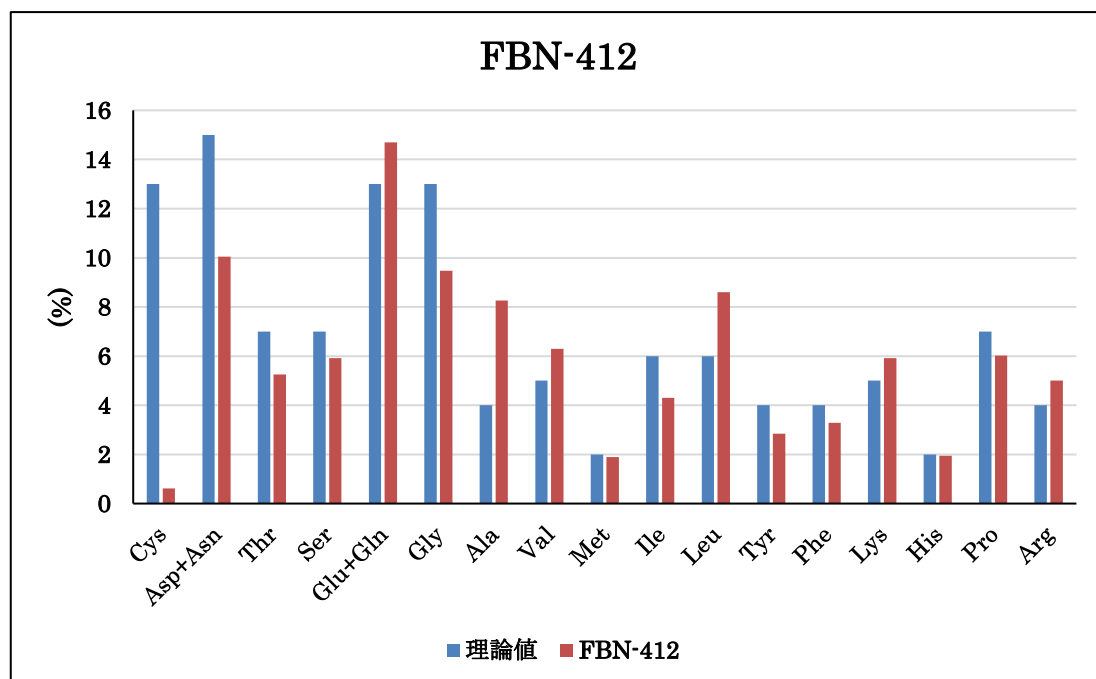


Fig.3-3-2 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成(サンプル No=FBN-412)

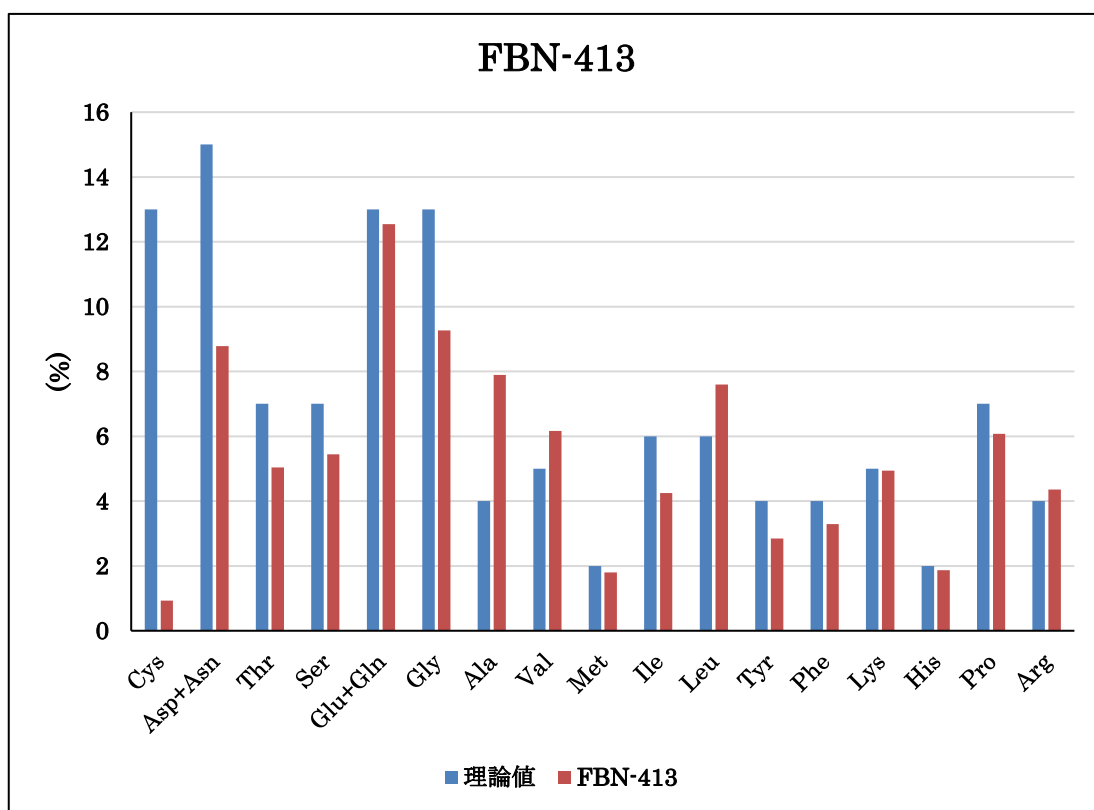


Fig.3-3-3 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成(サンプル No=FBN-413)

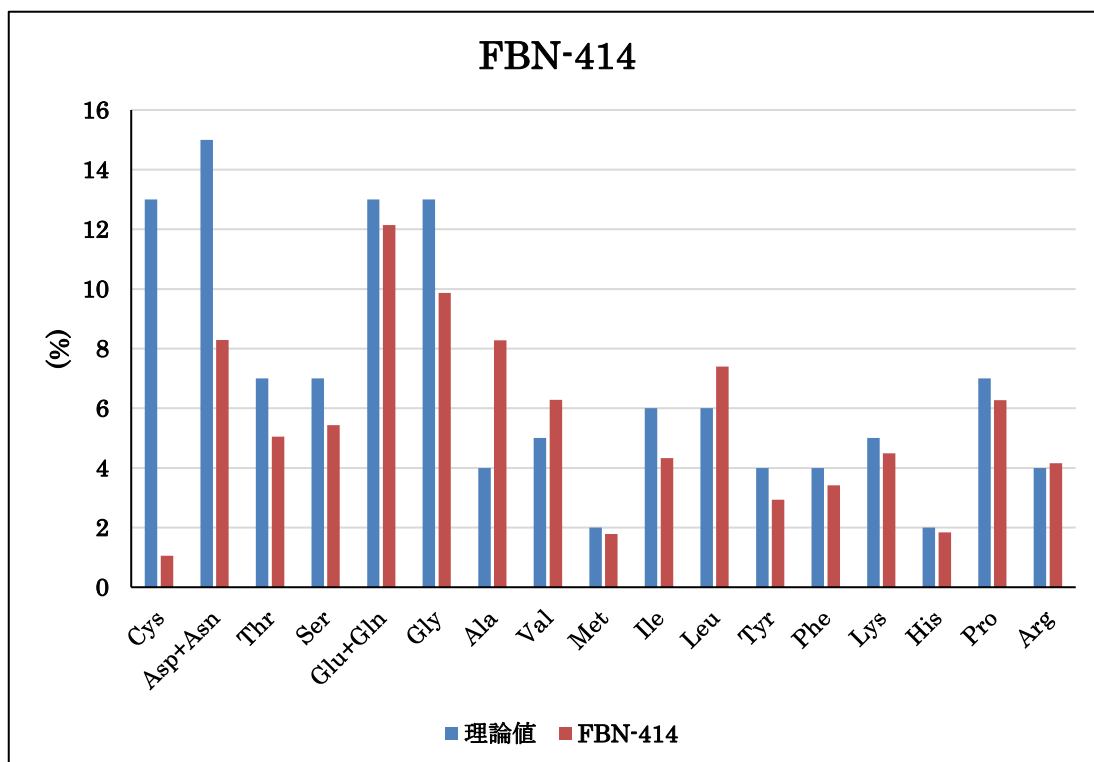


Fig.3-3-4 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成(サンプル No=FBN-414)

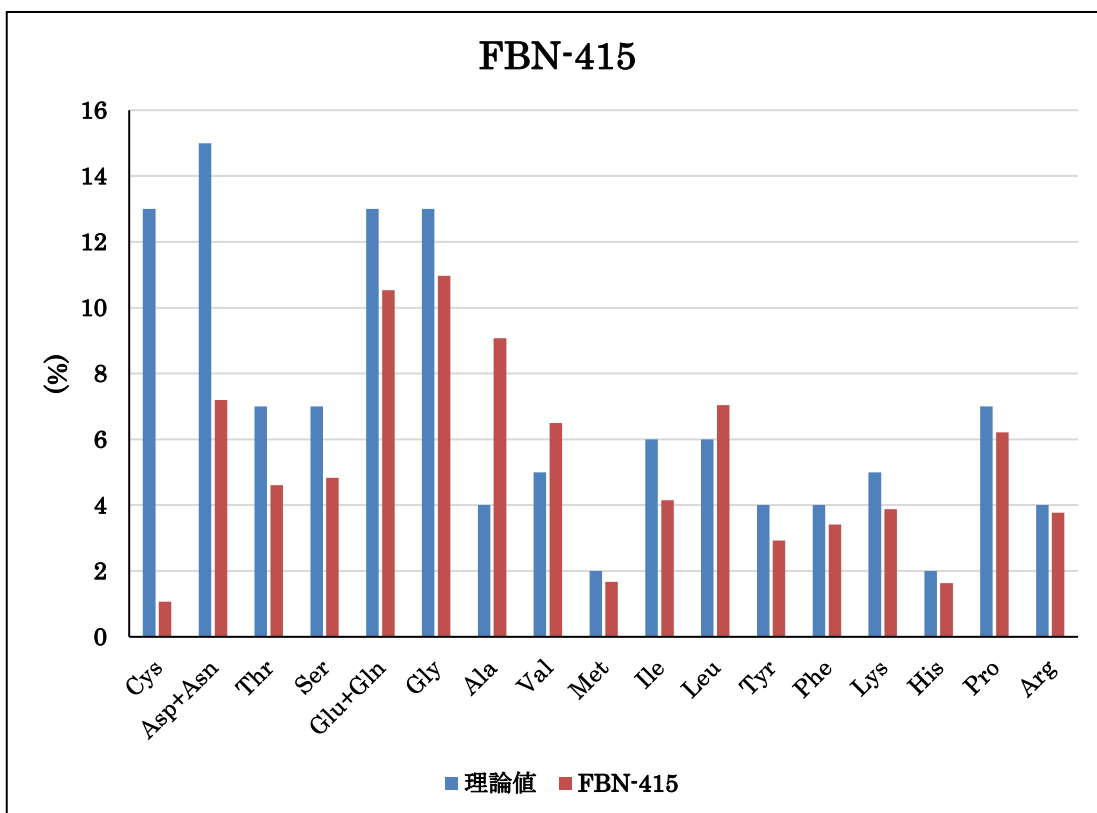


Fig.3-3-5 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成(サンプル No=FBN-415)

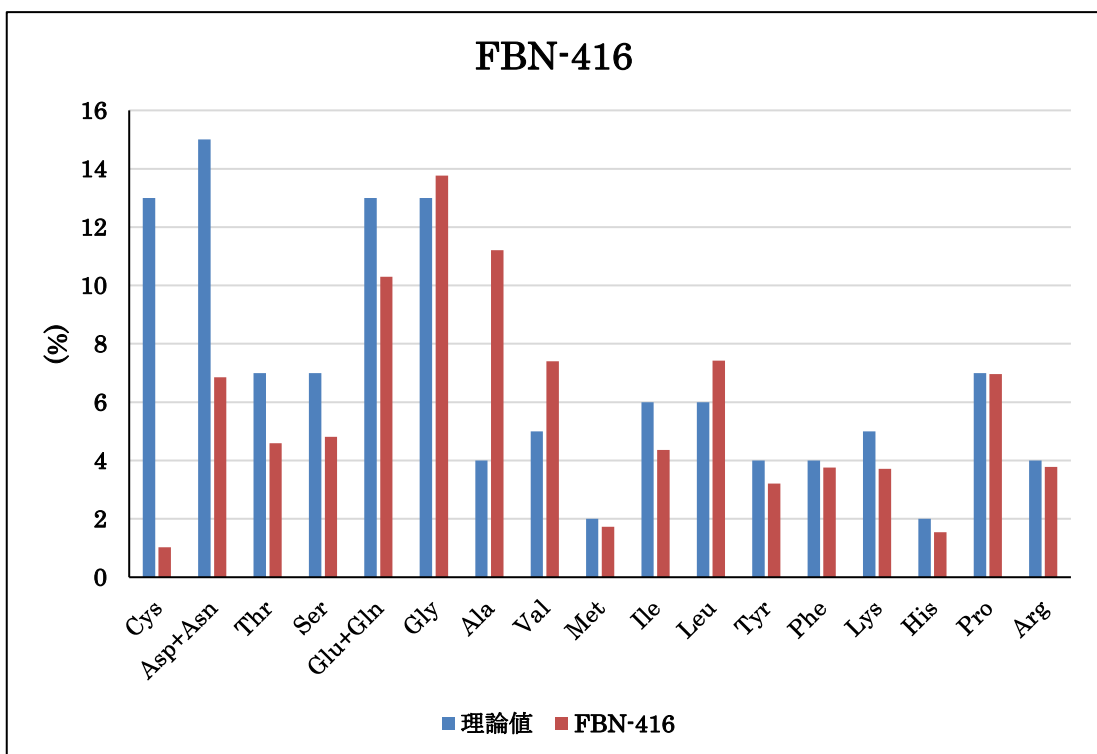


Fig.3-3-6 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成(サンプル No=FBN-416)

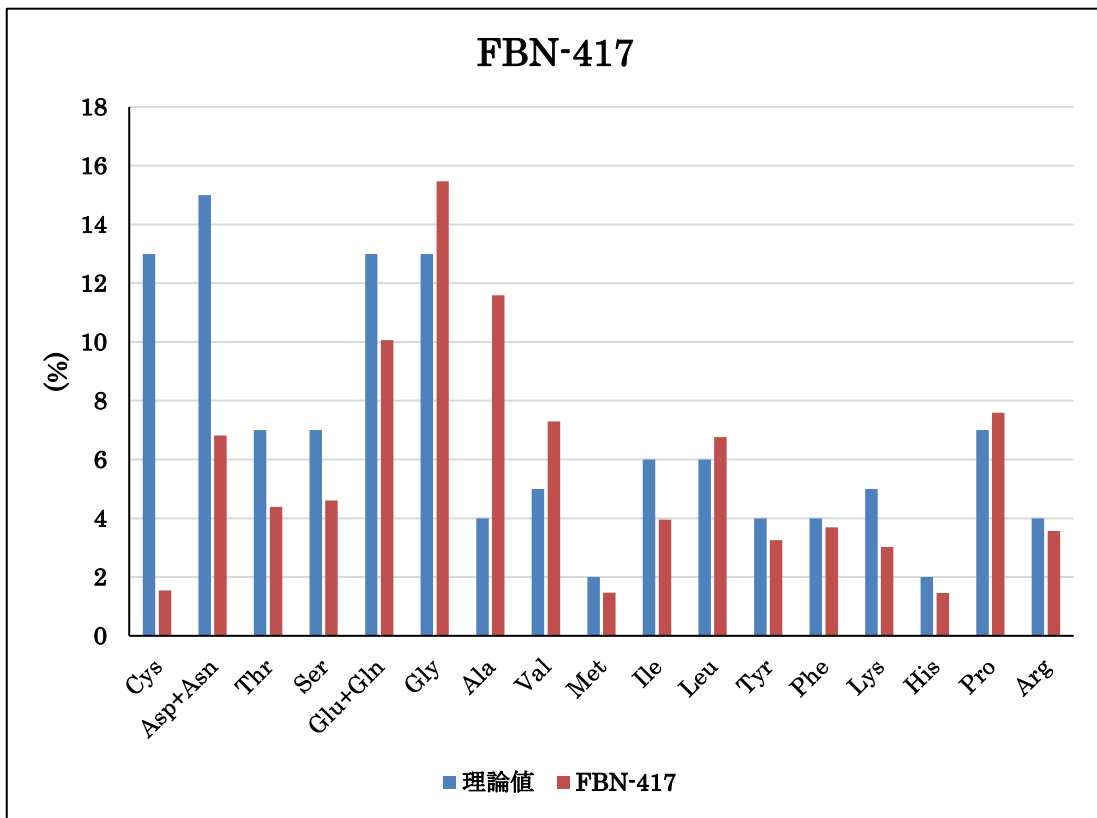


Fig.3-3-7 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成 (サンプル No=FBN-417)

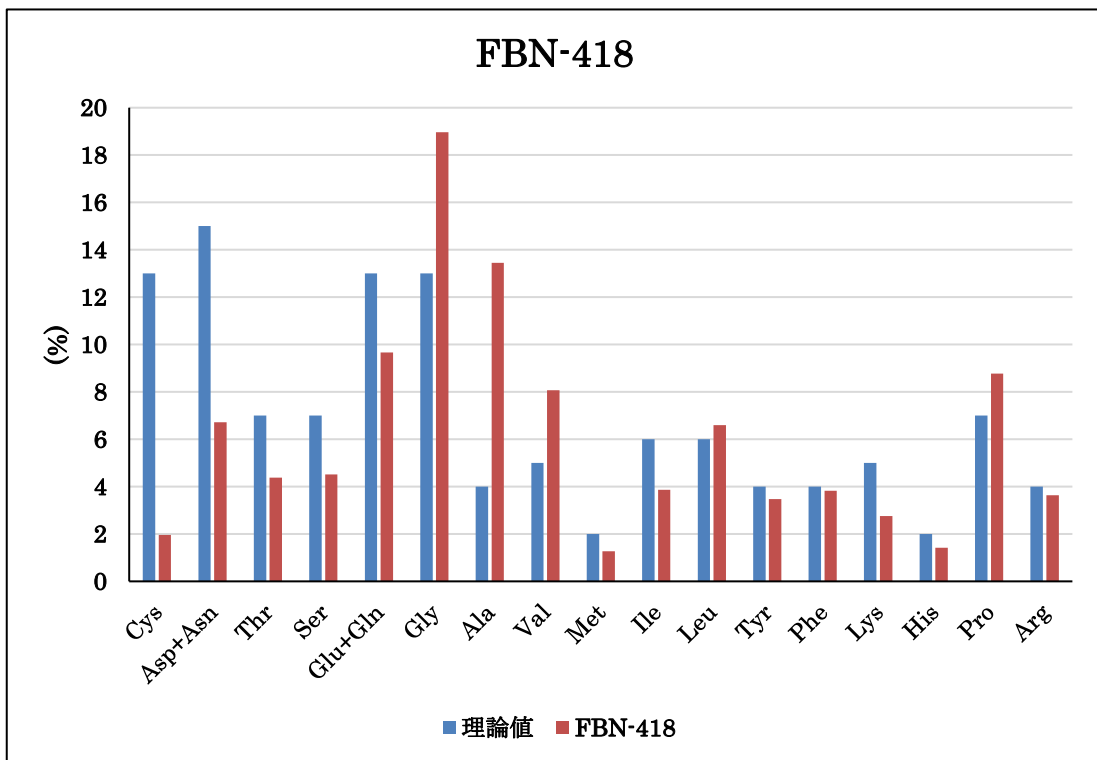


Fig.3-3-8 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成 (サンプル No=FBN-418)

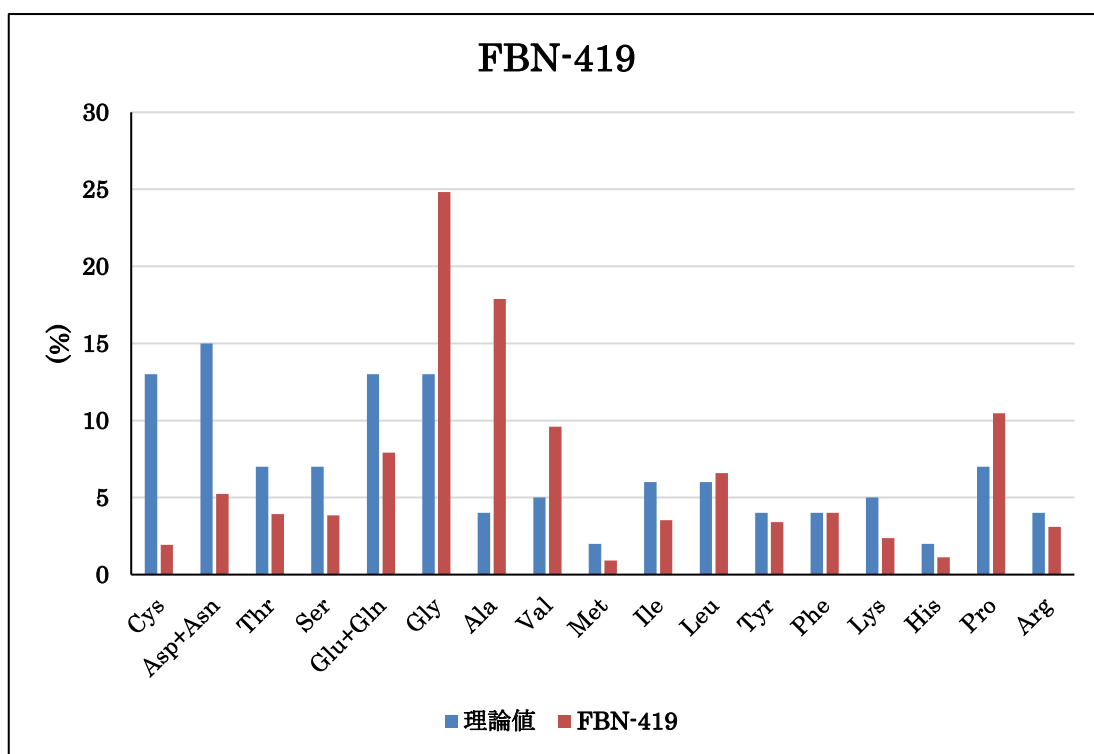


Fig.3-3-9 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成 (サンプル No=FBN-419)

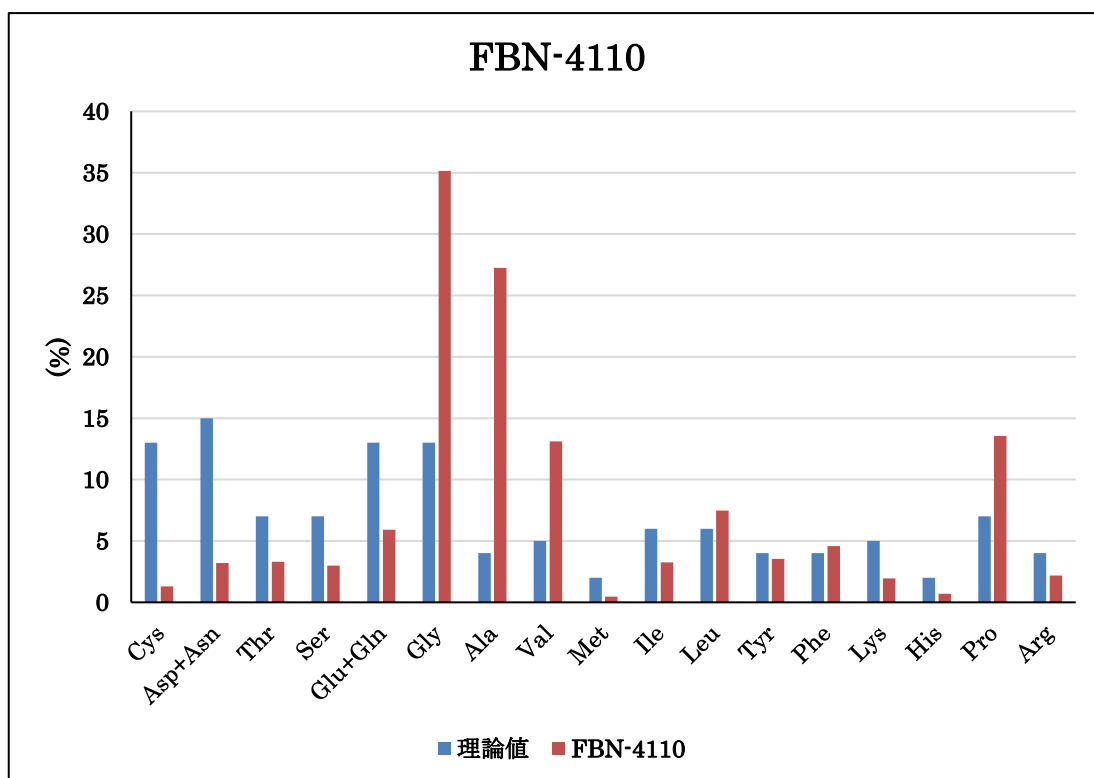


Fig.3-3-10 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成 (サンプル No=FBN-4110)

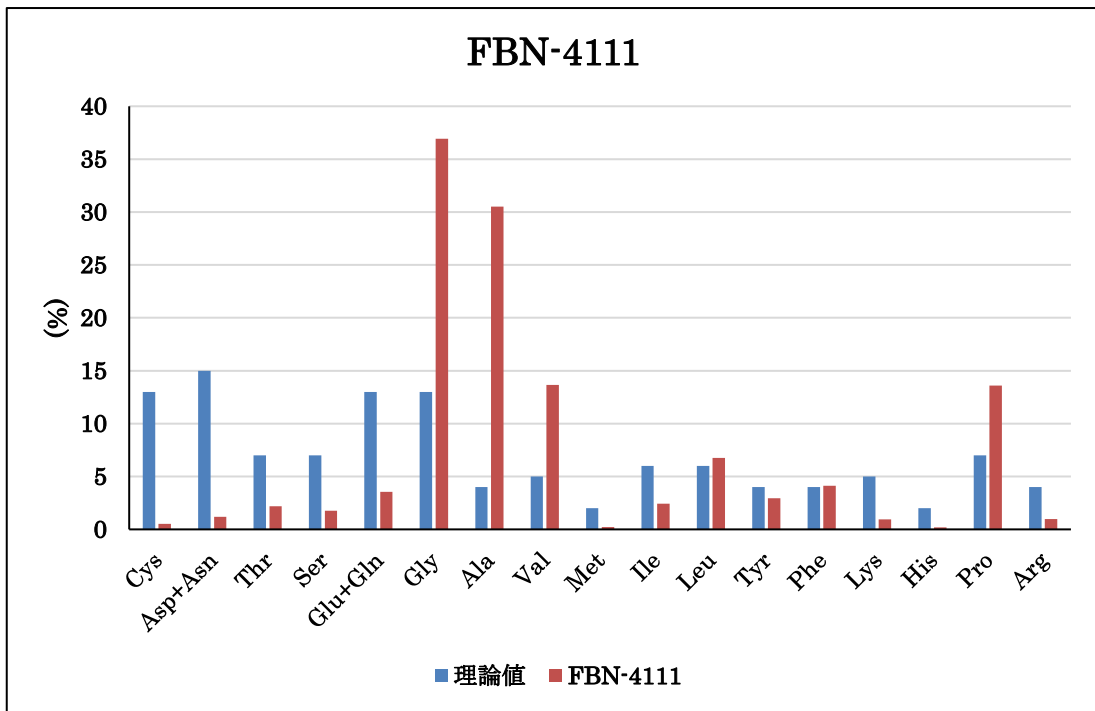


Fig.3-3-11 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成 (サンプル No=FBN-4111)

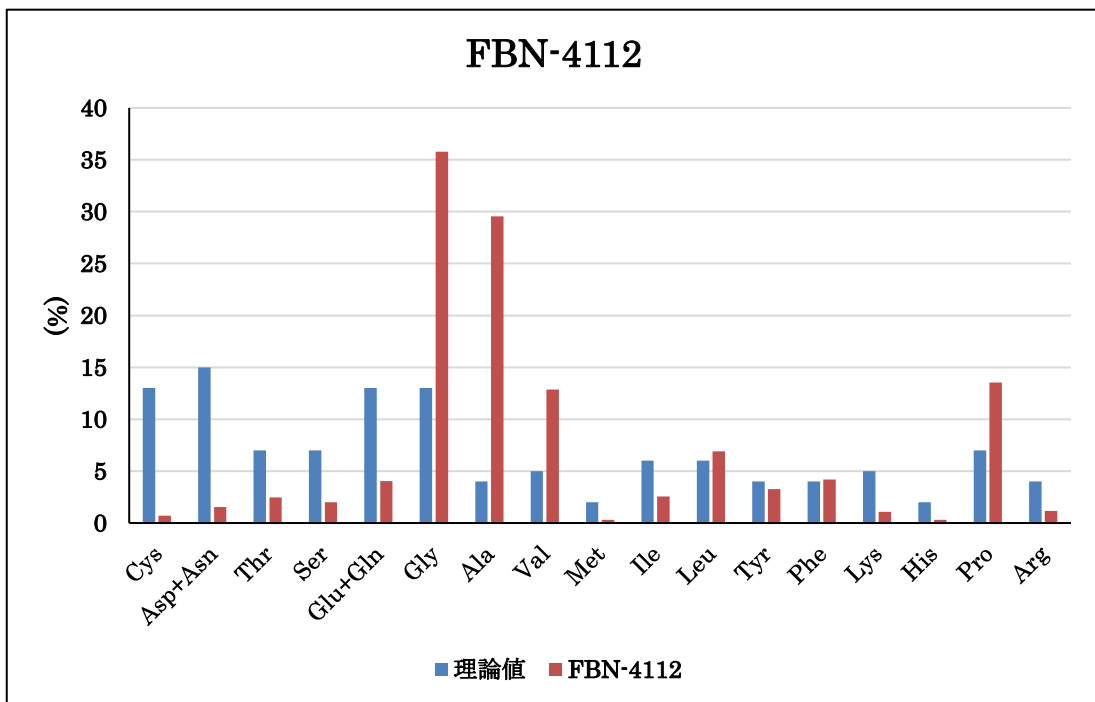


Fig.3-3-12 水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成 (サンプル No=FBN-4112)

理論値と測定結果を比較した結果、FBN-411~415 の Fibrillin は一部のアミノ酸を除いて理論値とほぼ同じ値であり、FBN-416~4112 の Fibrillin は Gly、Ala、Val、Pro の割合が高いということが分かった。

3-3-2 Elastin・Fibrillin の最適比率決定

Fig.3-1 のアミノ酸組成分析の結果から、各水溶性 Fibrillin の Elastin と Fibrillin の最適比率を求めた。(Fig.3-3-13~24) また、アミノ酸組成分析の結果より、Cystine・CysO₃OH の値が理論値と比較して大きく下回っていたため、最適比率決定の計算からは除外した。縦軸は 2-2-3 で記述した最適比率決定計算の式②である。グラフ中には Σ 各アミノ酸計算値と記述した。極小値を最適比率とした。X=Elastin、Y=Fibrillin の割合である。

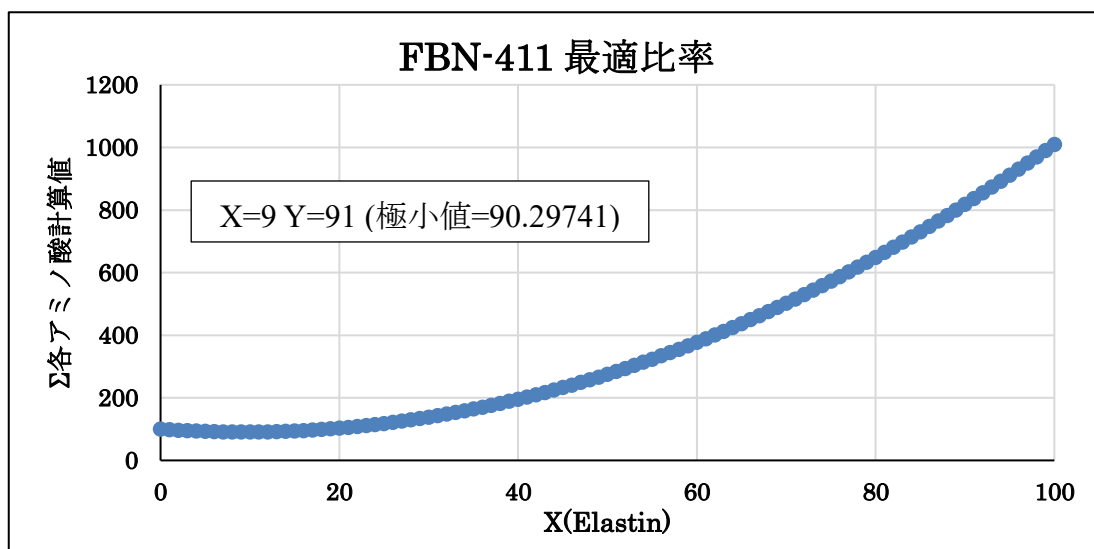


Fig.3-3-13 水溶性 Fibrillin の最適比率決定(サンプル No=FBN-411)

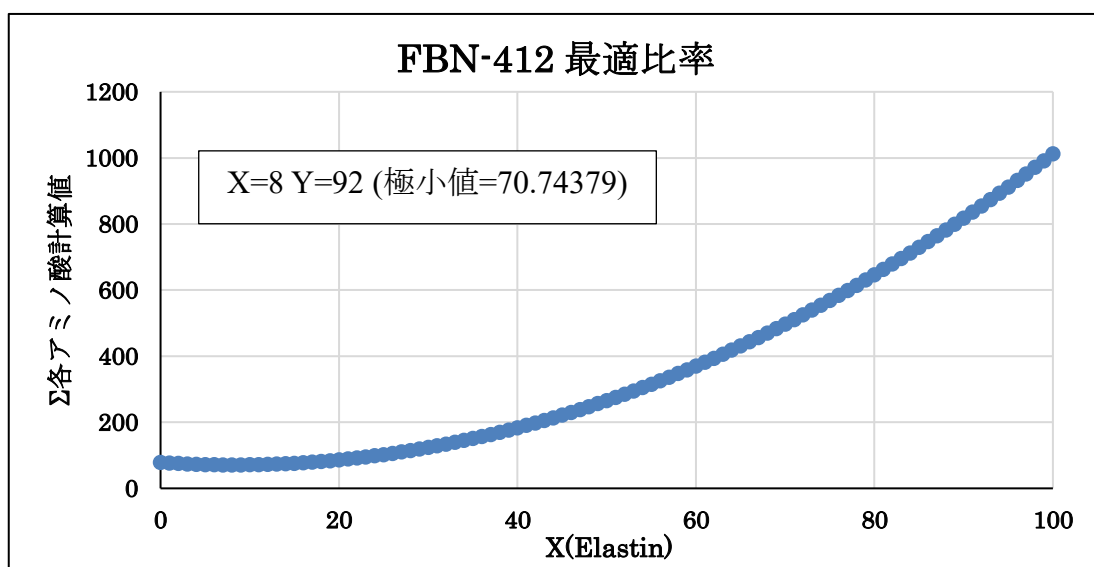


Fig.3-3-14 水溶性 Fibrillin の最適比率決定(サンプル No=FBN-412)

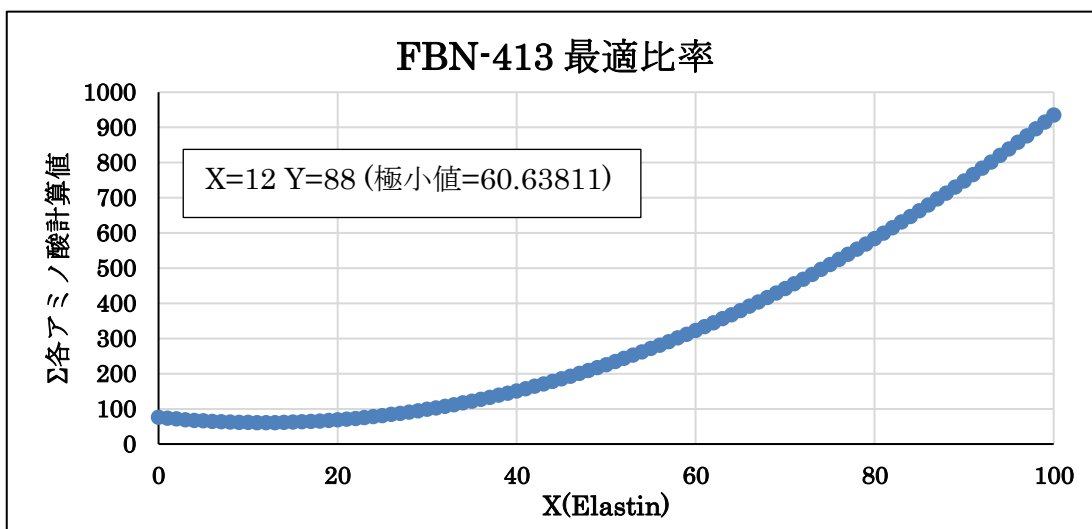


Fig.3-3-15 水溶性 Fibrillin の最適比率決定 (サンプル No=FBN-413)

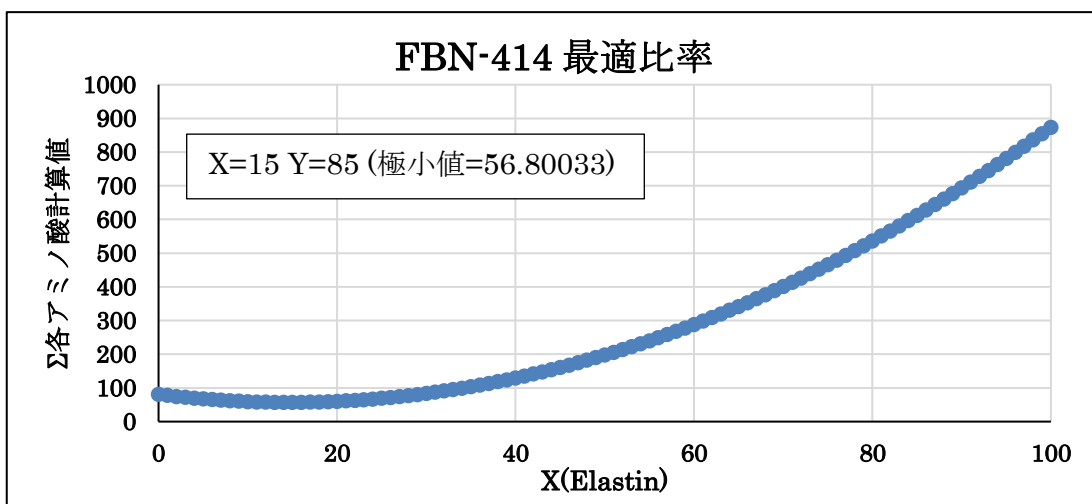


Fig.3-3-16 水溶性 Fibrillin の最適比率決定 (サンプル No=FBN-414)

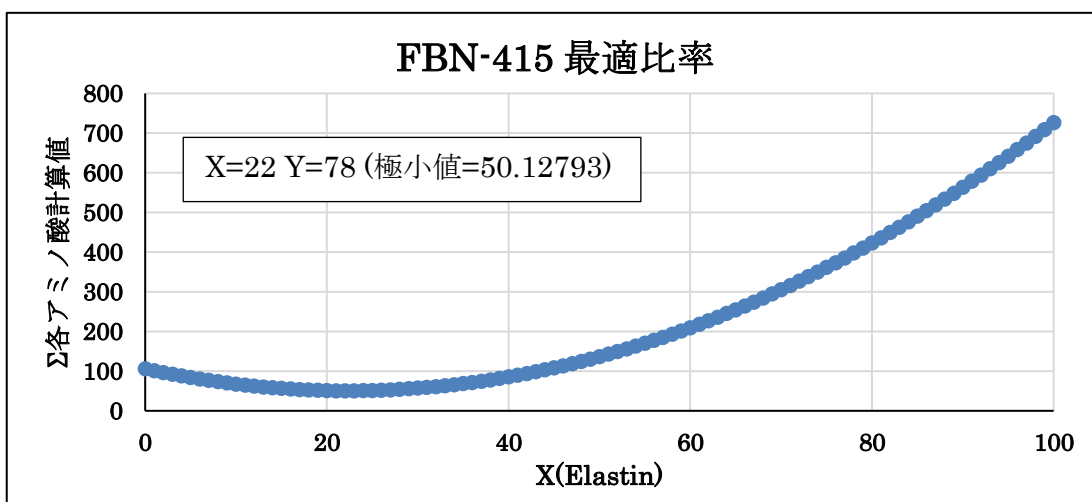


Fig.3-3-17 水溶性 Fibrillin の最適比率決定 (サンプル No=FBN-415)

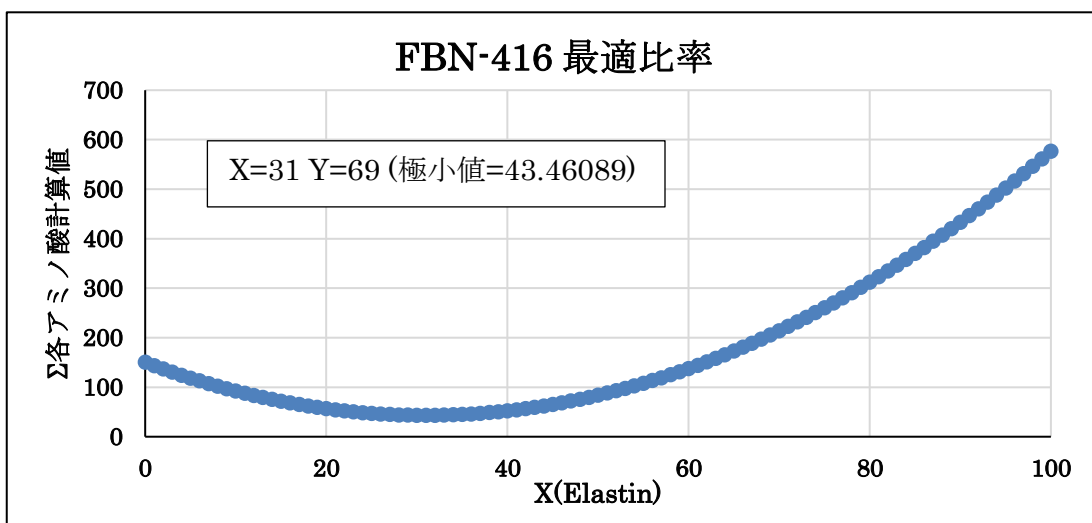


Fig.3-3-18 水溶性 Fibrillin の最適比率決定(サンプル No=FBN-416)

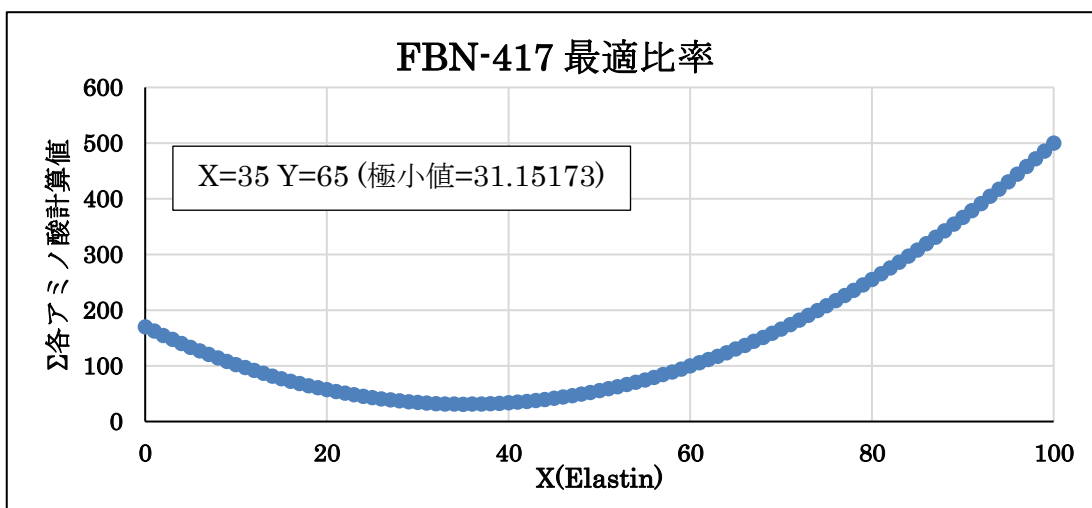


Fig.3-3-19 水溶性 Fibrillin の最適比率決定(サンプル No=FBN-417)

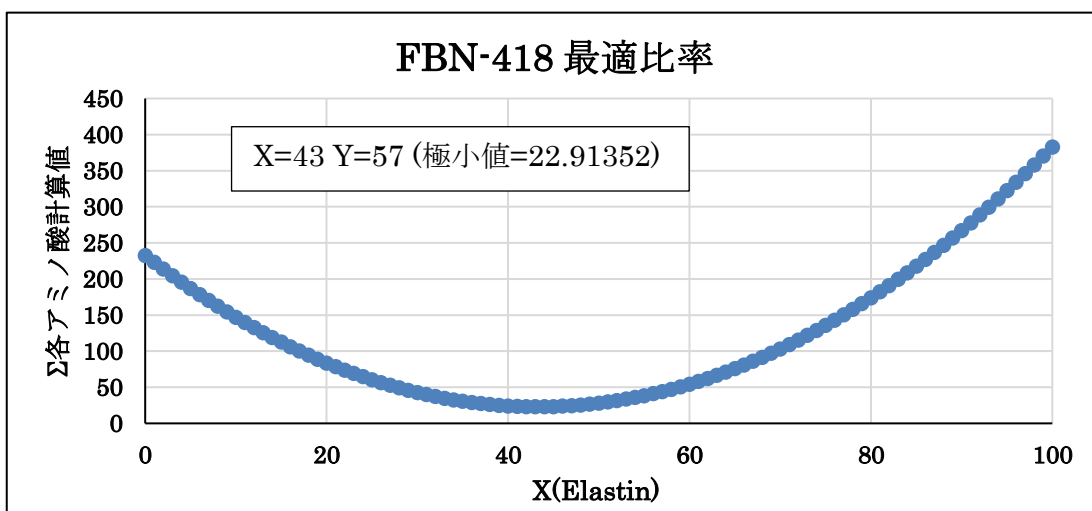


Fig.3-3-20 水溶性 Fibrillin の最適比率決定(サンプル No=FBN-418)

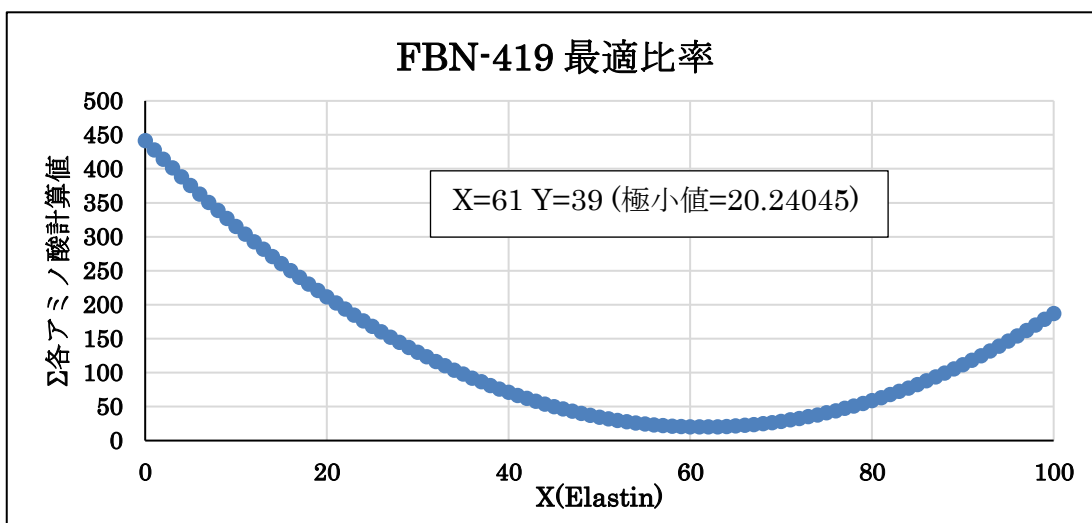


Fig.3-3-21 水溶性 Fibrillin の最適比率決定(サンプル No=FBN-419)

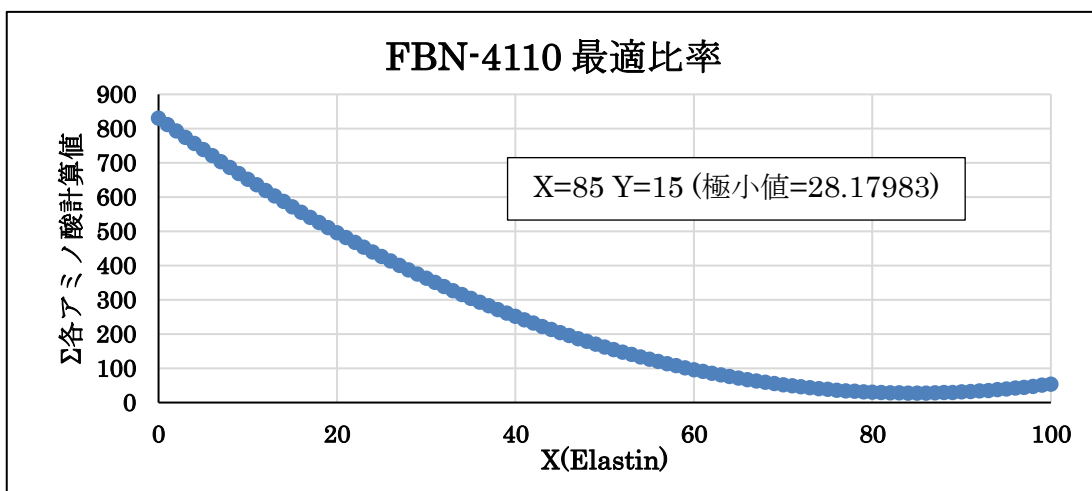


Fig.3-3-22 水溶性 Fibrillin の最適比率決定(サンプル No=FBN-4110)

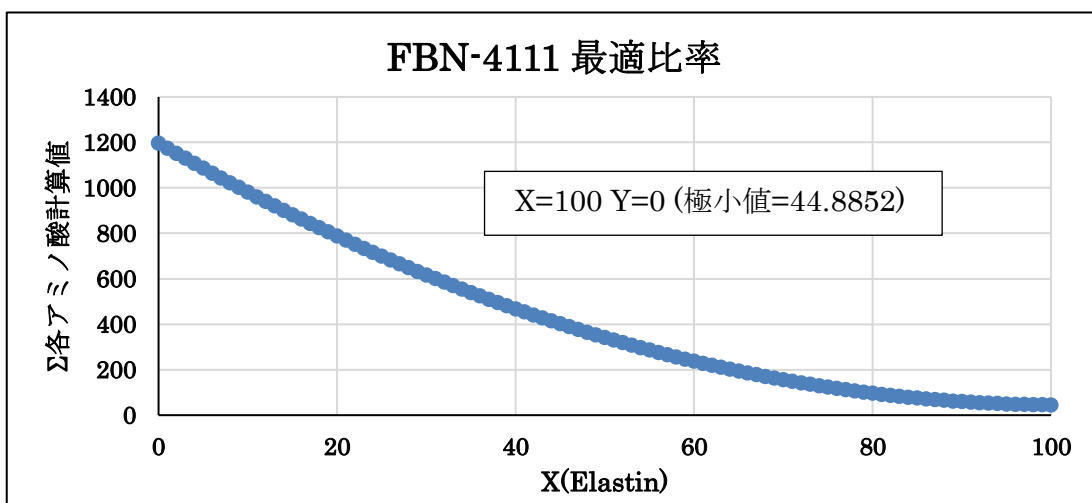


Fig.3-3-23 水溶性 Fibrillin の最適比率決定(サンプル No=FBN-4111)

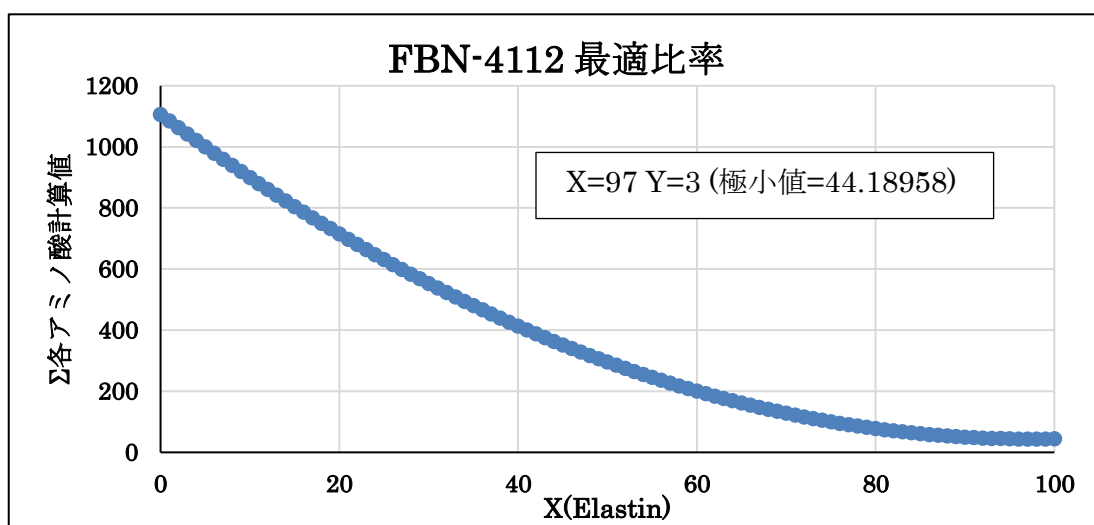


Fig.3-3-24 水溶性 Fibrillin の最適比率決定 (サンプル No=FBN-4112)

Fig.3-3-13~24 の結果をまとめ、Table.3-3-1 に示した。

Table.3-3-1 各水溶性 Fibrillin の Elastin・Fibrillin 含有率

No	X (Elastin)	Y (Fibrillin)
FBN-411	9	91
FBN-412	8	92
FBN-413	12	88
FBN-414	15	85
FBN-415	22	78
FBN-416	31	69
FBN-417	35	65
FBN-418	43	57
FBN-419	61	39
FBN-4110	85	15
FBN-4111	100	0
FBN-4112	97	3

FBN-411~8 は Fibrillin の割合が高く、FBN-419~4112 は Fibrillin の割合が低くなっていた。特に FBN-411、412 はそれぞれ 91%、92%と非常に高い Fibrillin 含有率を示していた。(Table.3-3-1)

3-3-3 高温架橋 Fibrillin Gel の作製

高温架橋により Fibrillin Gel を作製し、力学的強度測定及び膨潤度測定を行った。ゲルの作製条件は Table.3-3-2 に示した。

力学的強度測定はゲル作製後、取り出した直後のゲル(Fig.3-3-25)と、ゲル作製後取り出し、1 日脱イオン水に浸したゲル(Fig.3-3-26)で行った。膨潤度測定は 1 日脱イオン水に浸した後の直径 : D とゲルを取り出した直後の直径 : D_0 を測定し、 $(D/D_0)^3$ で求めた。(Fig.3-3-27)

Table.3-3-2 高温架橋 Fibrillin Gel の作製条件

	FBN-411~4112
Fibrillin (mg)	48
Dode-DSP (359.8mM) (μ l)	17.94
Milli-Q (μ l)	54.06

また、抽出した水溶性 Fibrillin との差を見るため、抽出した水溶性 Elastin についても各シュウ酸加熱回数ごとの No の水溶性 Elastin で高温架橋 Elastin Gel を作製した。力学的強度測定はゲル作製後取り出し、1 日脱イオン水に浸したゲルで行った。ゲルの作製条件は Table.3-3-3 に示した。

Table.3-3-3 高温架橋 Elastin Gel の作製条件

	PE41-1~12
Elastin (mg)	48
Dode-DSP (359.8mM) (μ l)	17.94
Milli-Q (μ l)	54.06

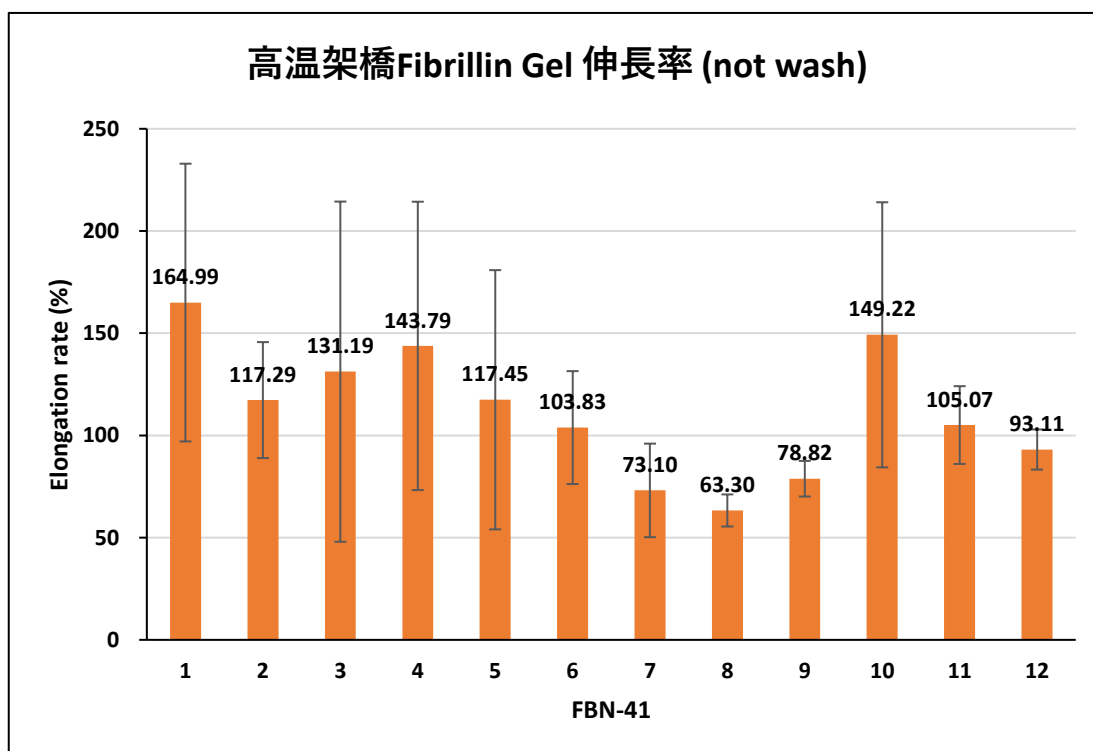
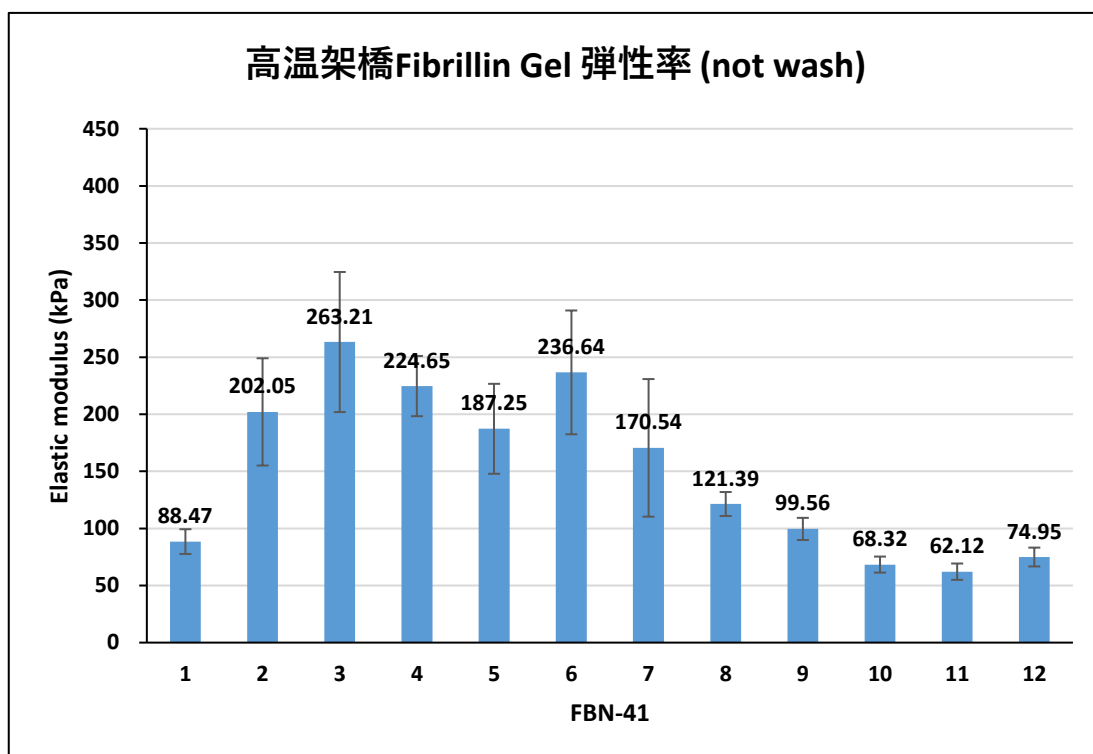


Fig.3-3-25 高温架橋 Fibrillin Gel の弾性率・伸長率 (not wash)

FBN-412~416 の Fibrillin は弾性率と伸長率が高く、FBN-417~4112 は弾性率が減少する傾向であった。(Fig.3-3-25)

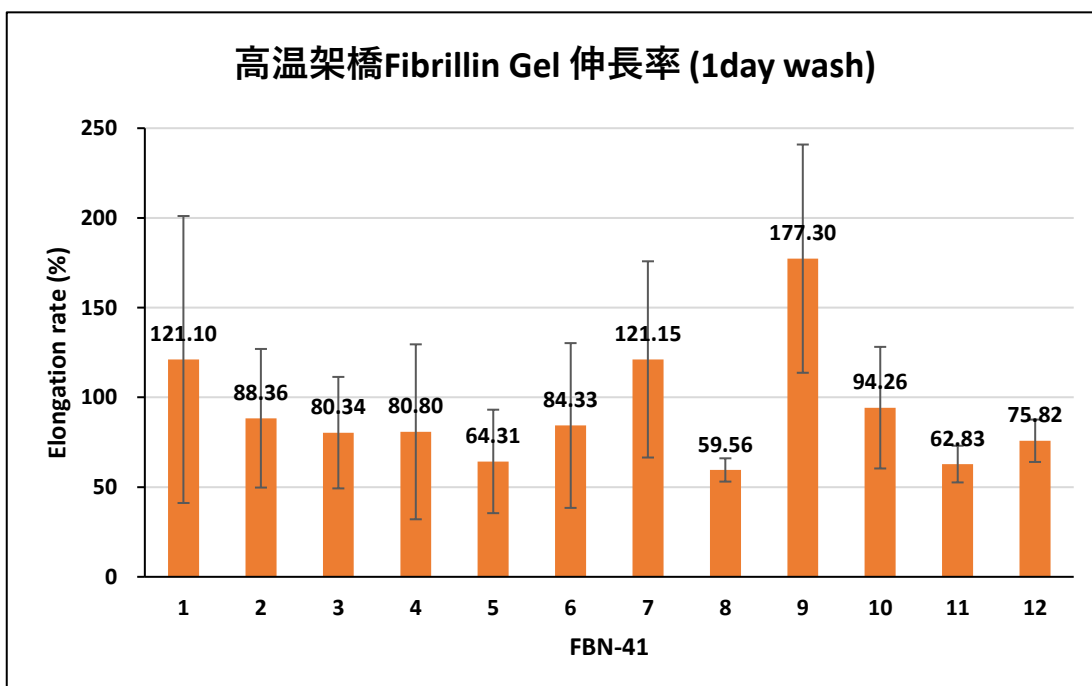
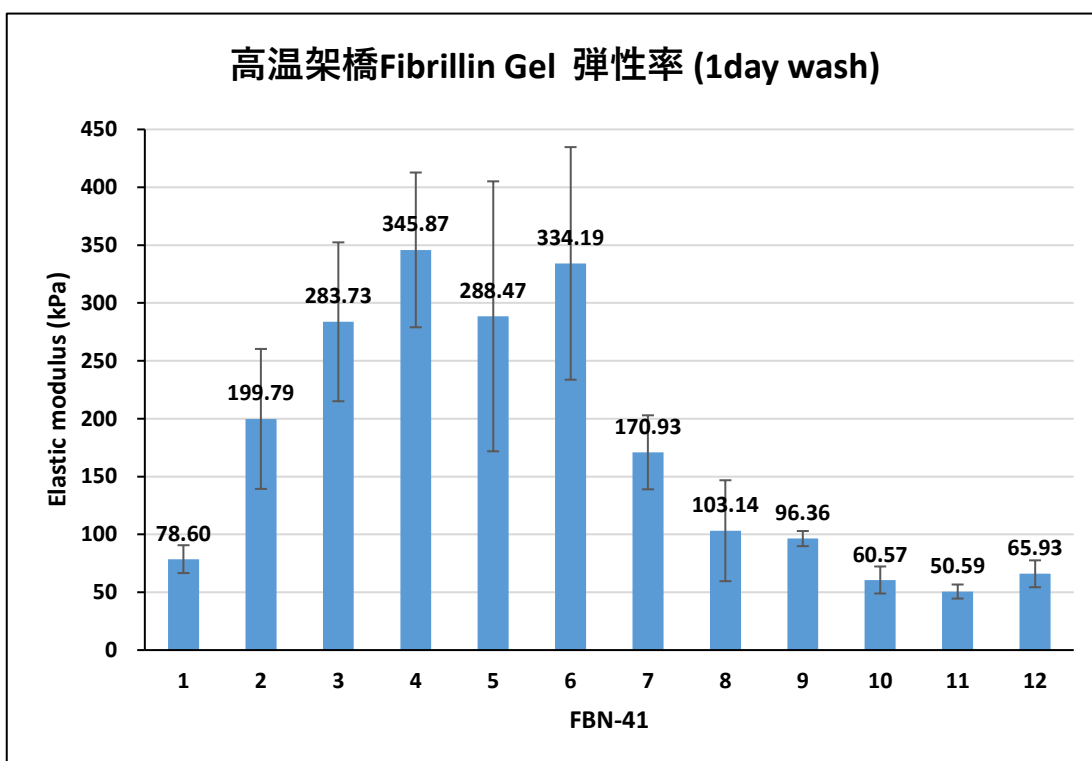


Fig.3-3-26 高温架橋 Fibrillin Gel の弾性率・伸長率(1day wash)

Fig3-3-25 の結果と同様で FBN-412~416 の Fibrillin は弾性率が高く、FBN417以降は低くなっており、伸長率はほとんどの No が Fig.3-3-25 よりも減少していた。(Fig.3-3-26)

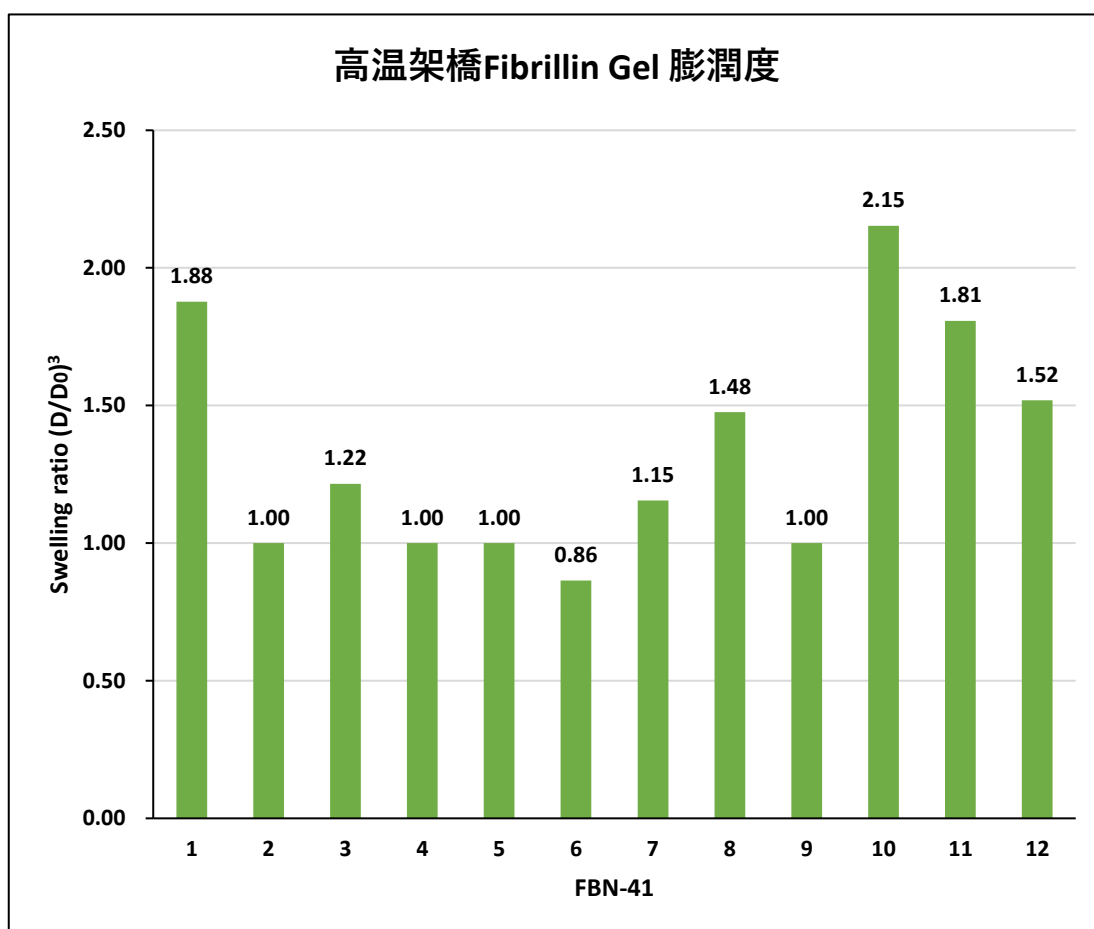


Fig.3-3-27 高温架橋 Fibrillin Gel の膨潤度

例外はあるが FBN-412~417 の Fibrillin は膨潤度が低く、FB-418~4112 の Fibrillin は膨潤度が高い傾向であった。(Fig.3-3-27)

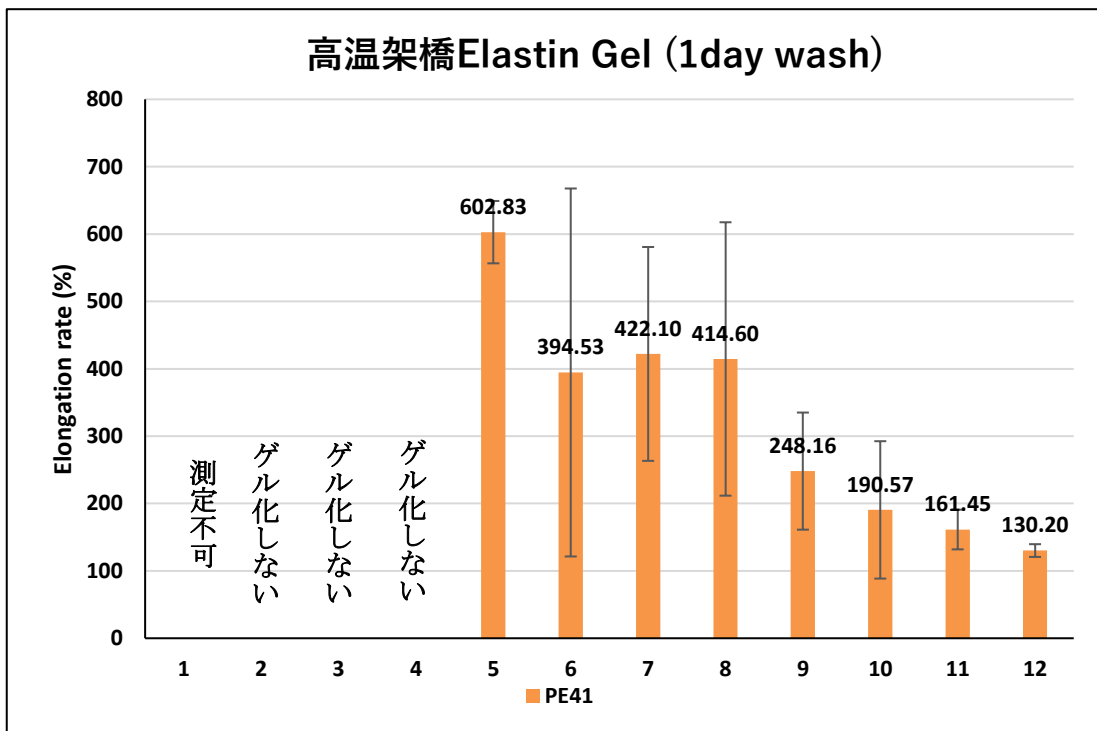
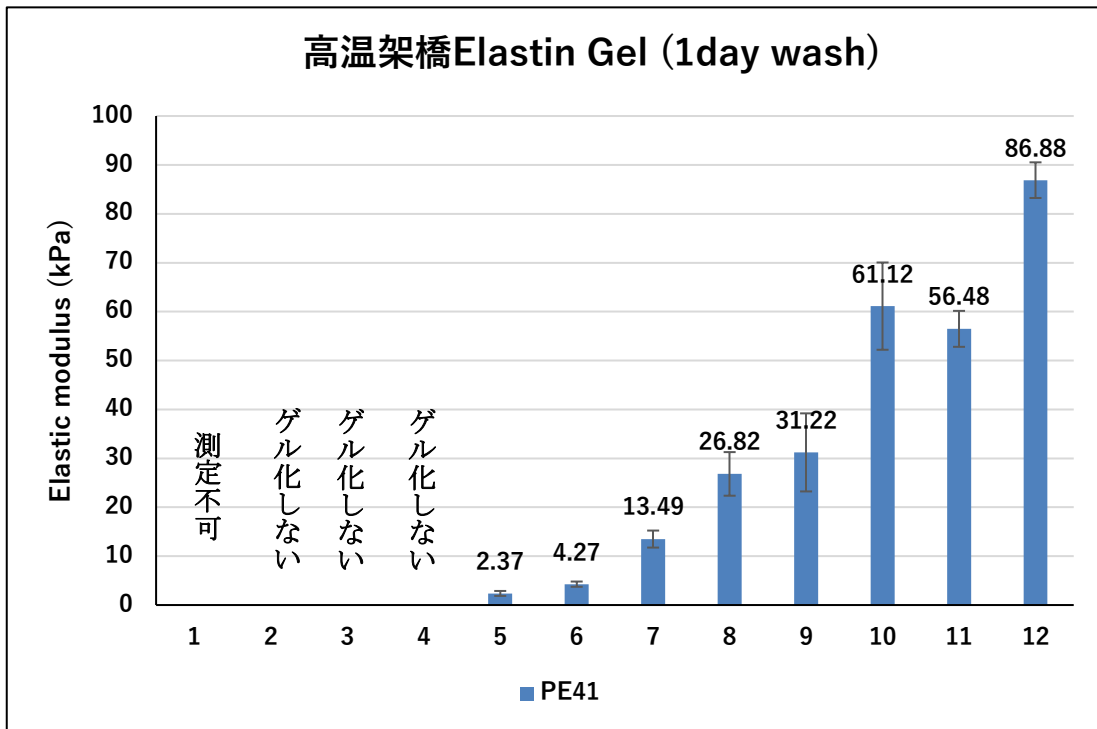


Fig.3-3-28 高温架橋 Elastin Gel の弾性率・伸長率(1day wash)

PE41-1~4 の Elastin はゲル化しないまたはゲル化したが測定不可だった。PE41-5 以降は No が大きくなるほど弾性率が大きくなり、伸長率は小さくなる傾向であった。(Fig.3-3-28)

3-3-4 低温架橋 Fibrillin Gel の作製

低温架橋により Fibrillin Gel を作製し、力学的強度測定及び膨潤度測定を行った。ゲルの作製条件は Table.3-3-4 に示した。

力学的強度測定はゲル作製後、取り出した直後のゲル(Fig.3-3-29)で行った。膨潤度測定は 1 日脱イオン水に浸した後の直径:D とゲルを取り出してすぐの直径:D₀を測定し、 $(D/D_0)^3$ で求めた。(Fig.3-3-30)

Table.3-3-4 低温架橋 Fibrillin Gel の作製条件

	FBN-411~4112
Fibrillin (mg)	48
Dode-DSP (359.8mM) (μl)	17.94
Milli-Q (μl)	42.54
Na ₂ CO ₃ aq (500mM) (μl)	11.52

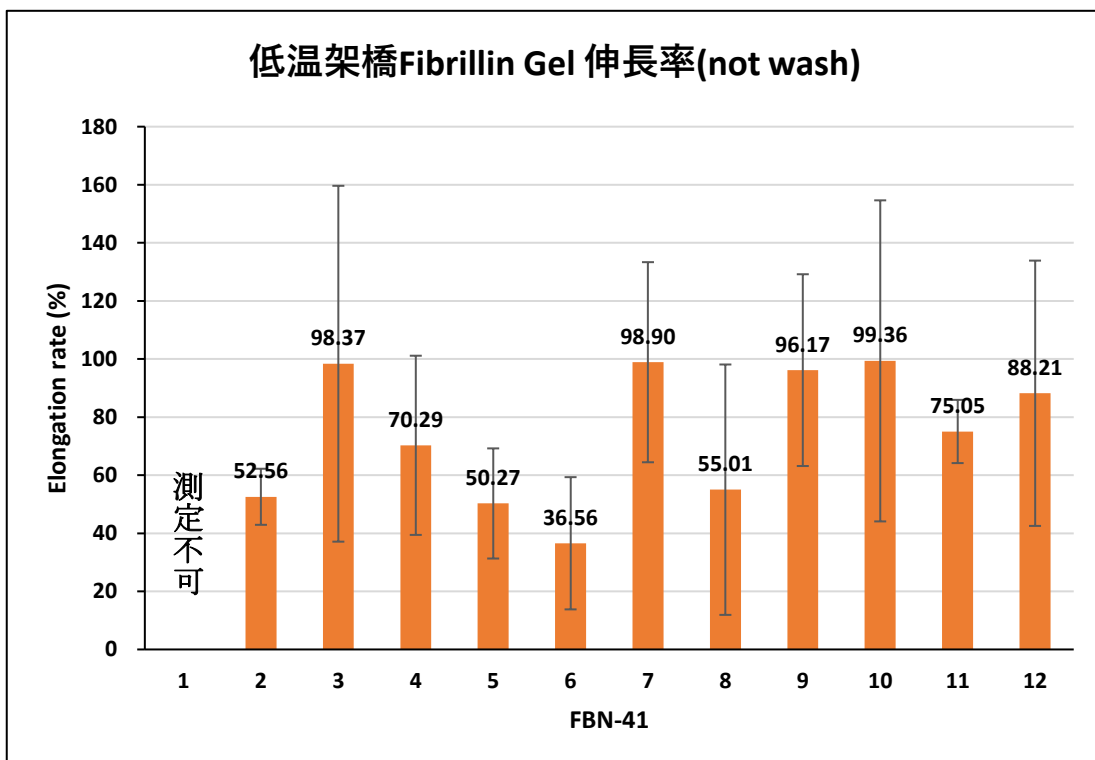
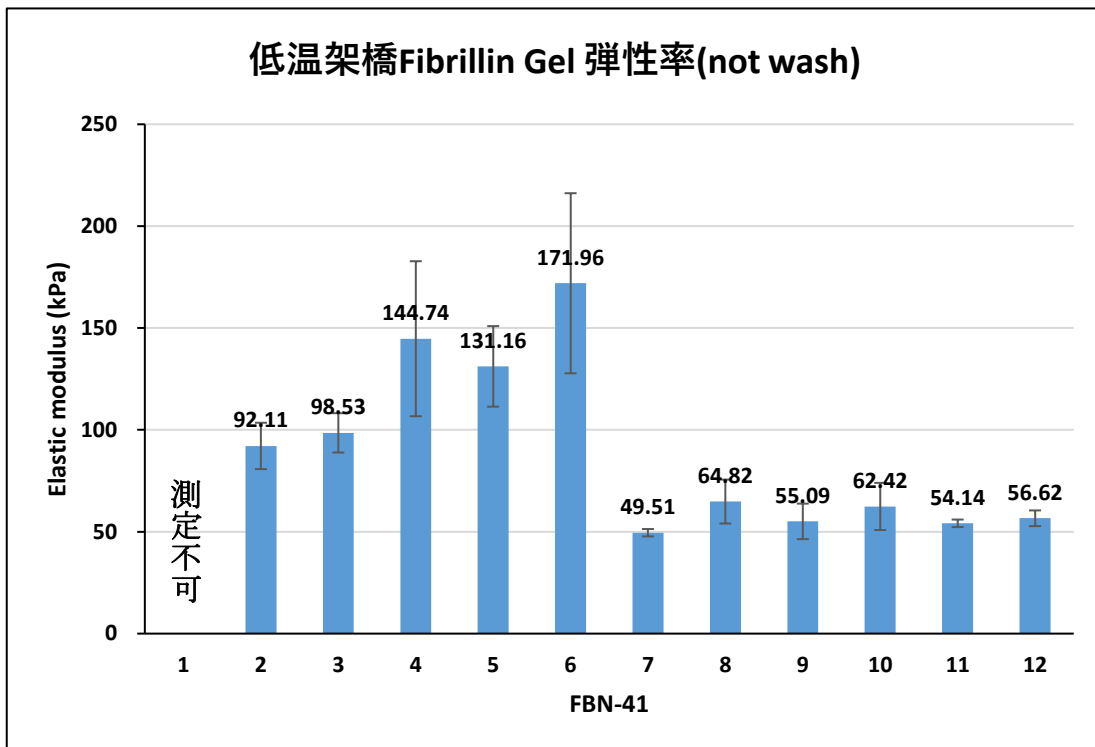


Fig.3-3-29 低温架橋 Fibrillin Gel の弾性率・伸長率(not wash)

FBN-411 は測定不可だった。FBN-412~416 の Fibrillin は弾性率が高く、FBN417~4112 の Fibrillin は低くなっている傾向であった。(Fig.3-3-29)

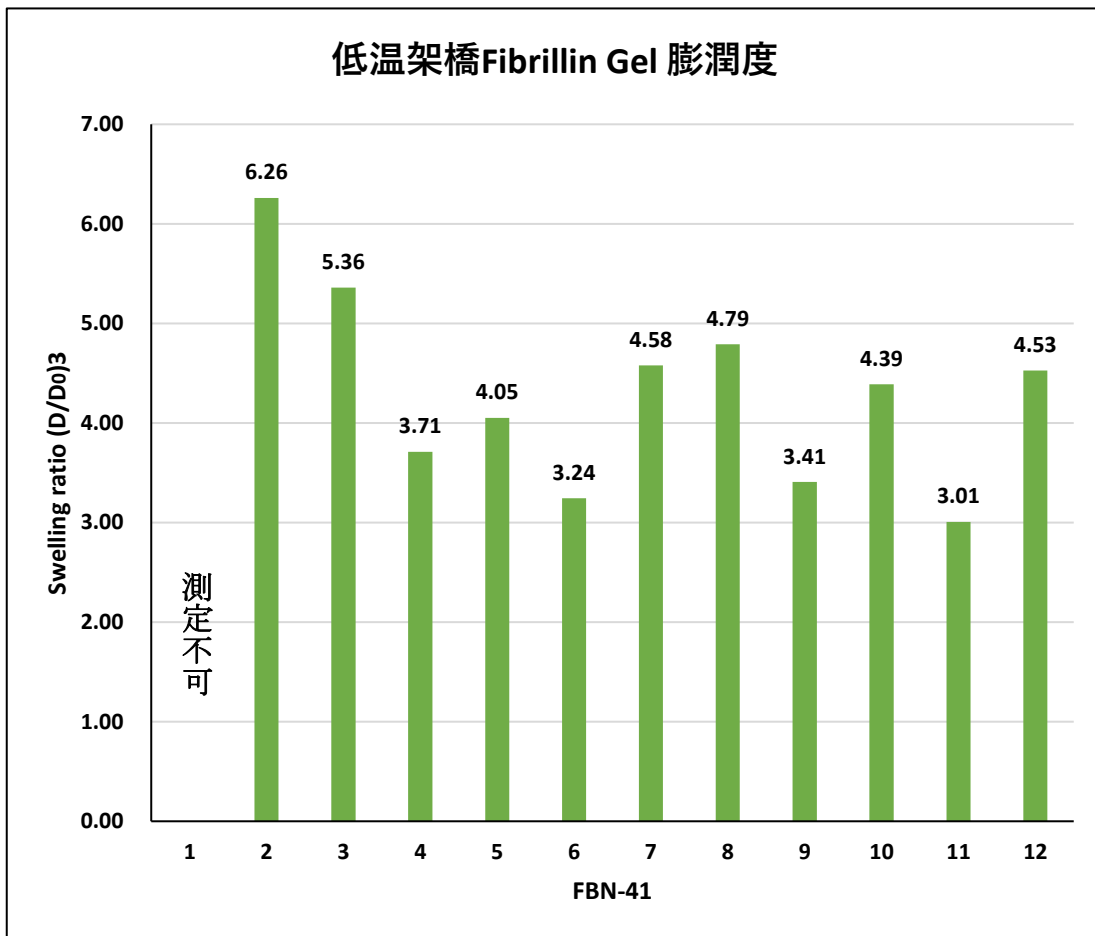


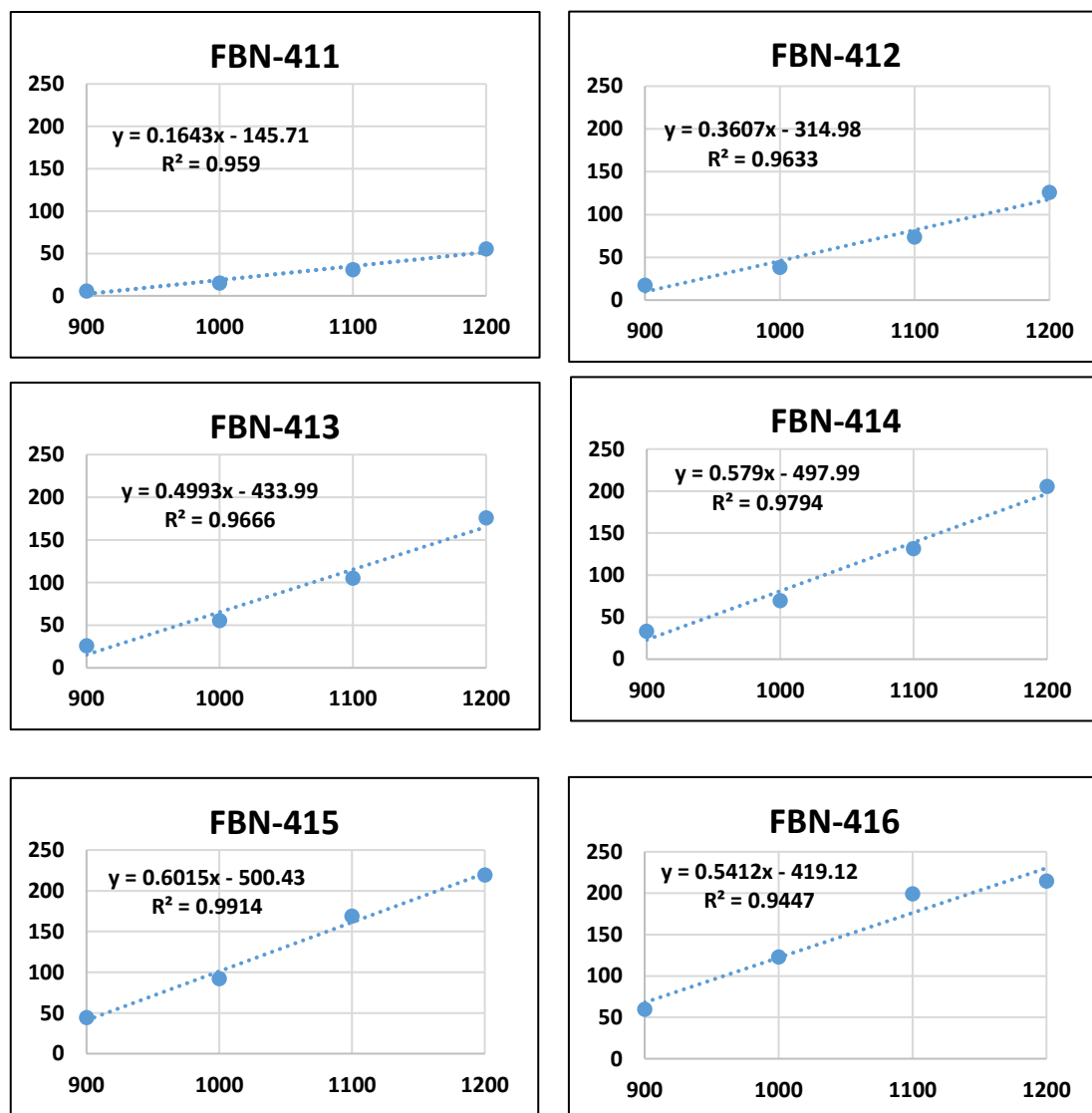
Fig.3-3-30 低温架橋 Fibrillin Gel の膨潤度

FBN-411 は分解しており、測定不可であった。その他の No は高温架橋 Fibrillin Gel の膨潤度 (Fig.3-3-27) と比較すると、全体的に膨潤度は高かった。(Fig.3-3-30)

3-3-5 Fibrillin 含有率の検量線作製

アミノ酸組成分析により Fibrillin:Elastin の割合が分かった。高温架橋 Fibrillin Gel を作製し脱イオン水で洗浄した後、自家蛍光により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。撮影時に輝度を変化させる Gain(Master)の値を 100 刻みで変化させそれぞれ画像を撮影した。撮影後画像解析ソフト「ZEN」を用い、画像のヒストグラムで表示される算術平均輝度(Arithmetic mean intensity)を記録した。(Fig.3-3-31)

縦軸: Arithmetic mean intensity、横軸: Gain(Master)、(n=6)



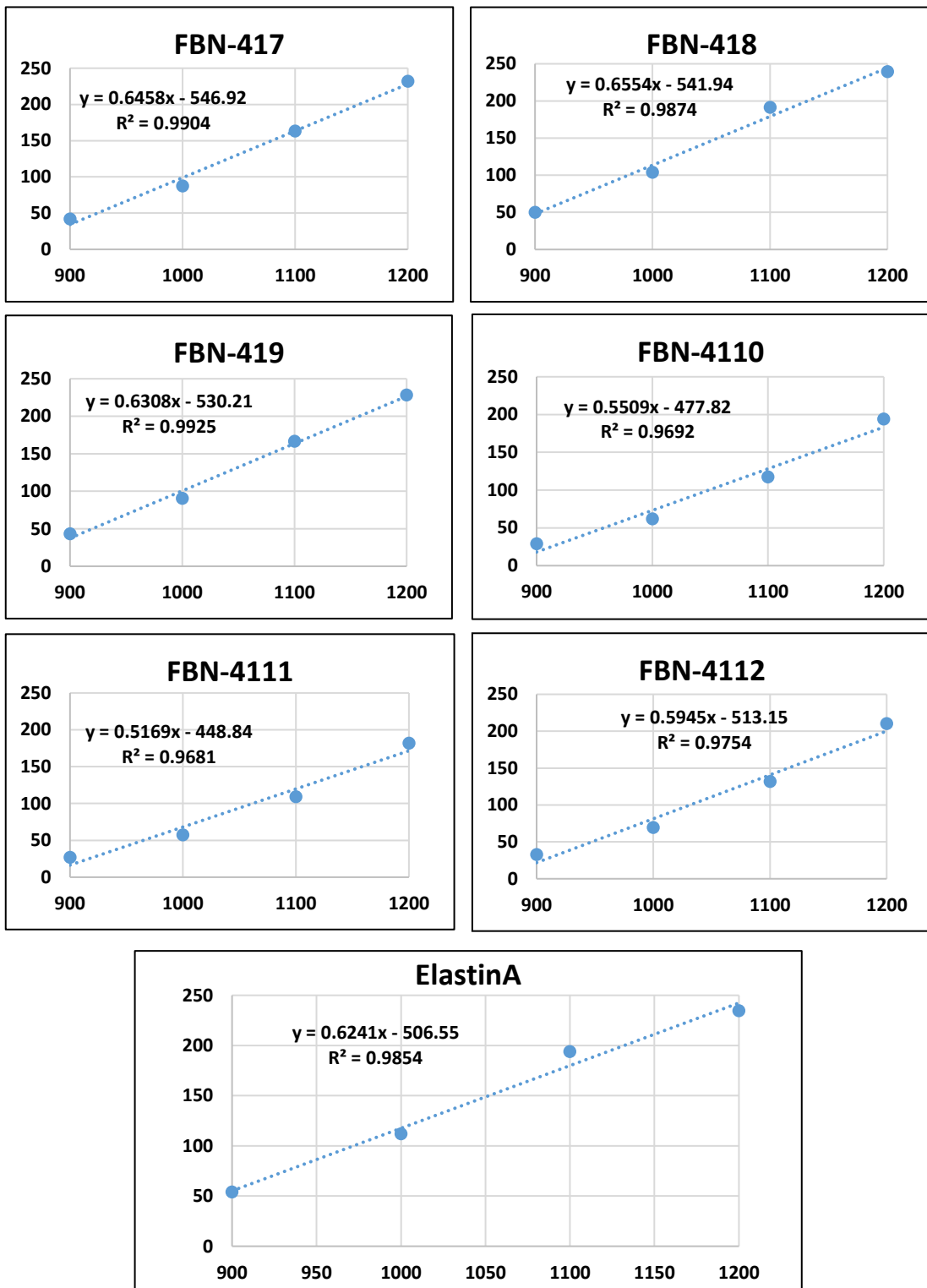


Fig.3-3-31 Fibrillin Gel の輝度解析

輝度解析により測定した各水溶性 Fibrillin の直線の傾き (Fig.3-3-31) に補正值として膨潤度を掛けた値を縦軸、Fibrillin 含有率を横軸としてプロットし検量線を作製した。(Fig.3-3-32)

	Fibrillin(%)	グラフの傾き	膨潤度	傾き×膨潤度
FBN-411	91	0.1643	3.615	0.593945
FBN-412	92	0.3607	1.268	0.457368
FBN-413	88	0.4993	1.219	0.608647
FBN-414	85	0.579	1.197	0.693063
FBN-415	78	0.6015	1	0.6015
FBN-416	69	0.5412	0.917	0.49628
FBN-417	65	0.6554	1.382	0.849873
FBN-418	57	0.6554	1.382	0.905763
FBN-419	39	0.6308	1.284	0.809947
FBN-4110	15	0.5509	1.572	0.866015
FBN-4111	0	0.5169	2.053	1.061196
FBN-4112	3	0.5945	2.221	1.320385

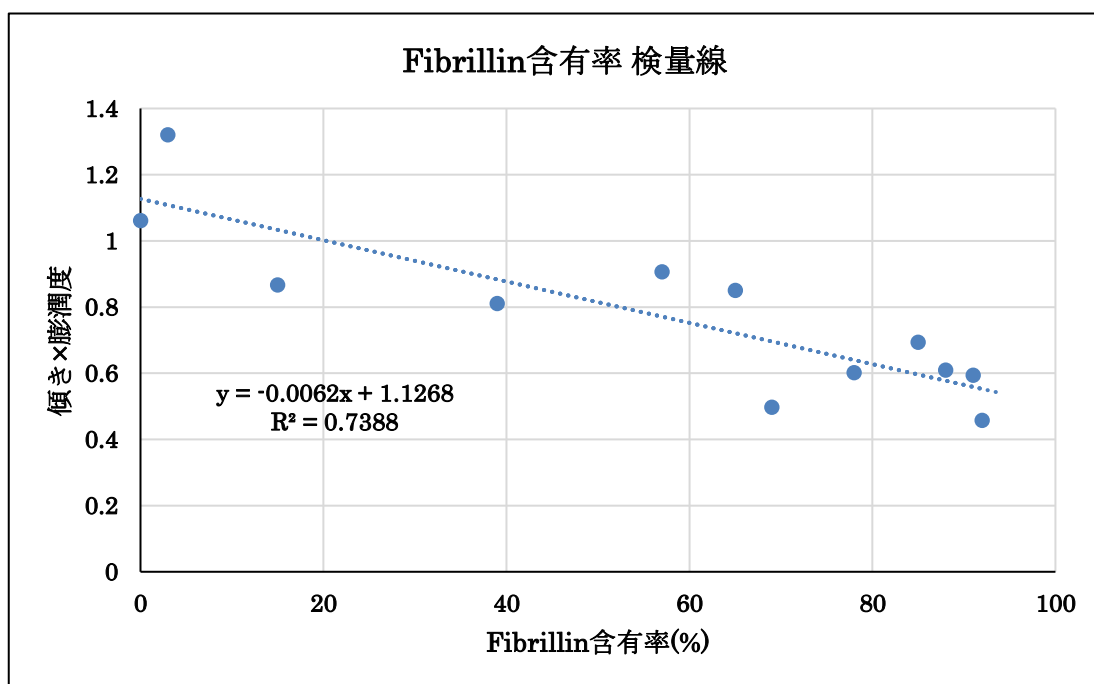


Fig.3-3-32 Fibrillin 含有率検量線

共焦点レーザー顕微鏡の観察結果と膨潤度を掛けた値とアミノ酸組成分析の結果をプロットして検量線を作製できた。(Fig.3-3-32)

3-3-6 水溶性 Fibrillin の凝集温度測定

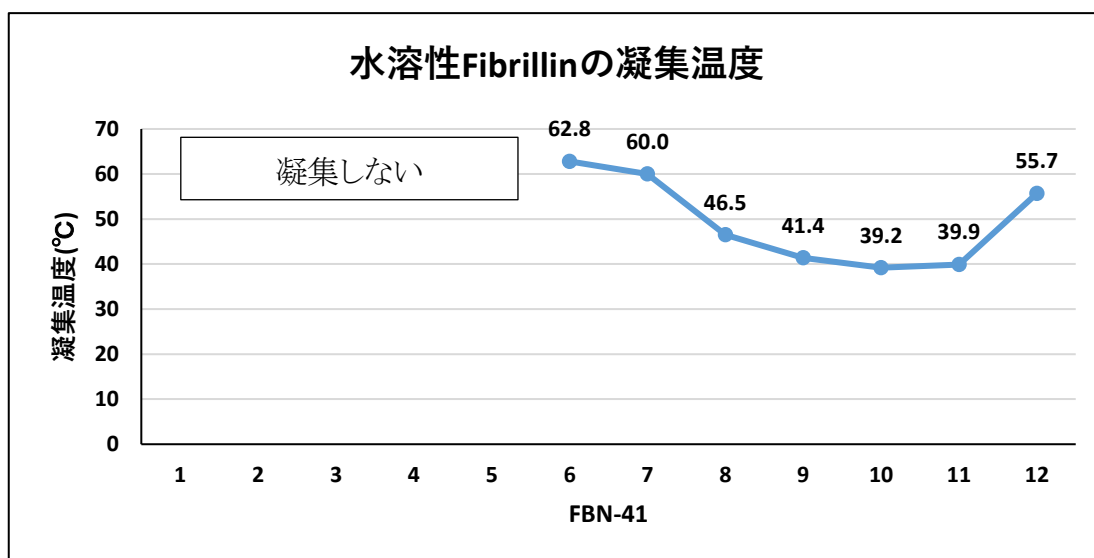


Fig.3-3-33 水溶性 Fibrillin の凝集温度

FBN411~5 は 70℃を超えても凝集しなかった。FBN-416 以降は No が大きくなるにつれて凝集温度が低くなる傾向であった。(Fig.3-3-33)

また、水溶性 Fibrillin との差を見るため、抽出した水溶性 Elastin についても各シユウ酸加熱回数ごとの No の 1% Elastin 水溶液で凝集温度測定を行った。

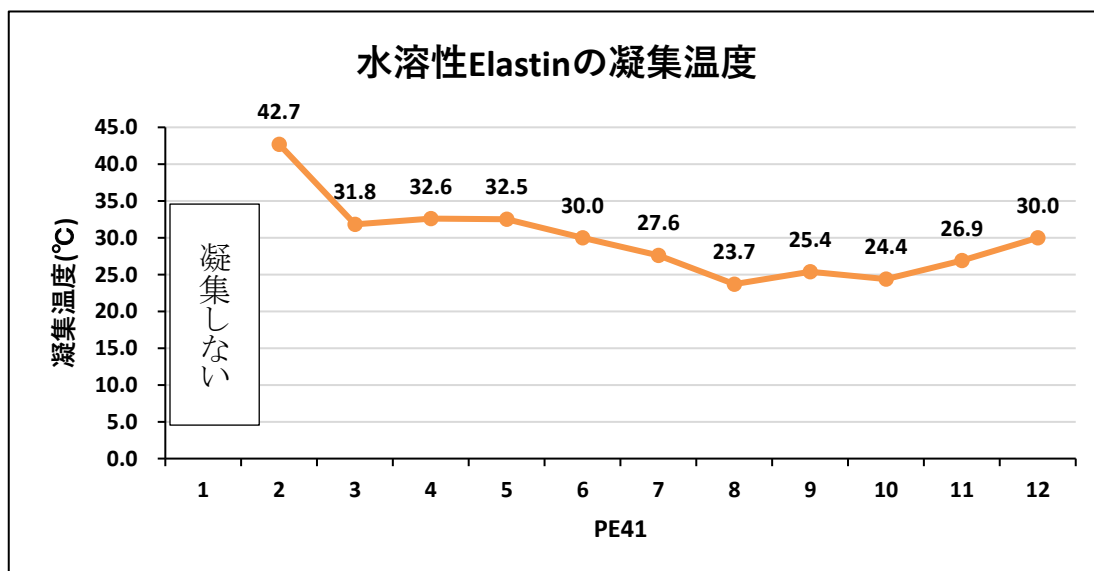


Fig.3-3-34 水溶性 Elastin の凝集温度

PE41-1 は凝集しなかった。PE41-2 以降は No が大きくなるにつれて凝集温度が低くなる傾向であった。(Fig.3-3-34)

3-3-7 Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

抽出した水溶性 Fibrillin の分子量を知るために SDS-PAGE を 5~20% グラジエントアクリルアミドゲル(分子量分画: 5~400kDa)で行った。サンプル抽出した水溶性 Fibrillin の 12 種類と分子量の比較のため Collagen を用いた。(Table.3-3-5) サンプルは 0.22 μ m のフィルターに通した後サンプルバッファーと 1:1 で混合し、レーンにアプライした。

Table3-3-5 アプライしたサンプル

レーン	サンプル
①	FBN-411
②	FBN-412
③	FBN-413
④	FBN-414
⑤	FBN-415
⑥	FBN-416
⑦	FBN-417
⑧	FBN-418
⑨	FBN-419
⑩	FBN-4110
⑪	FBN-4111
⑫	FBN-4112
⑬	Collagen Type I
⑭	Collagen Type III

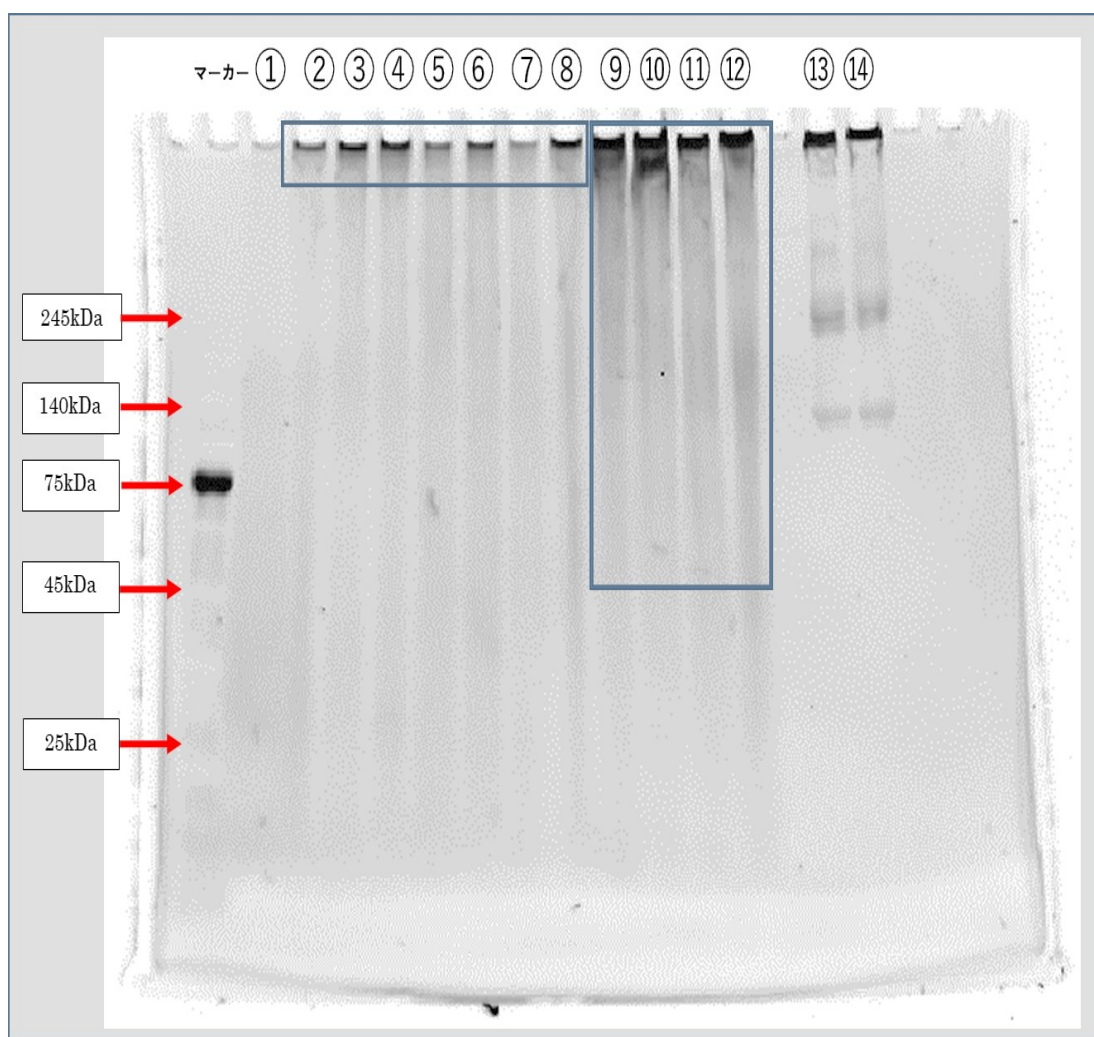


Fig.3-3-35 水溶性 Fibrillin の SDS-PAGE

FBN-411 では反応は見られなかった。FBN-412~418 では 400kDa 付近の高い分子量の範囲で反応があった。FBN-419~4112 は 400kDa 付近で高い反応が見られたが、それ以下の 45kDa 付近まで反応が見られた。(Fig.3-3-35)

3-3-8 Western blot (WB)

作製した水溶性 Fibrillin に Fibrillin-1 抗体が反応するのかを確認するために SDS-PAGE を行った後、アクリルアミド中のタンパクを PVDF 膜に転写する Western blot を行った。用いた抗体を Table.3-3-6 に、アプライしたサンプルを Table.3-3-7 に示した。

Table.3-3-6 用いた抗体

一次抗体(2000 倍希釈)	二次抗体(4000 倍希釈)
Anti Fibrillin-1 Mouse monoclonal antibody	HRP Goat anti Mouse IgG

Table3-3-7 アプライしたサンプル

レーン	サンプル
①	FBN-411
②	FBN-412
③	FBN-413
④	FBN-414
⑤	FBN-415
⑥	FBN-416
⑦	FBN-417
⑧	FBN-418
⑨	FBN-419
⑩	FBN-4110
⑪	FBN-4111
⑫	FBN-4112

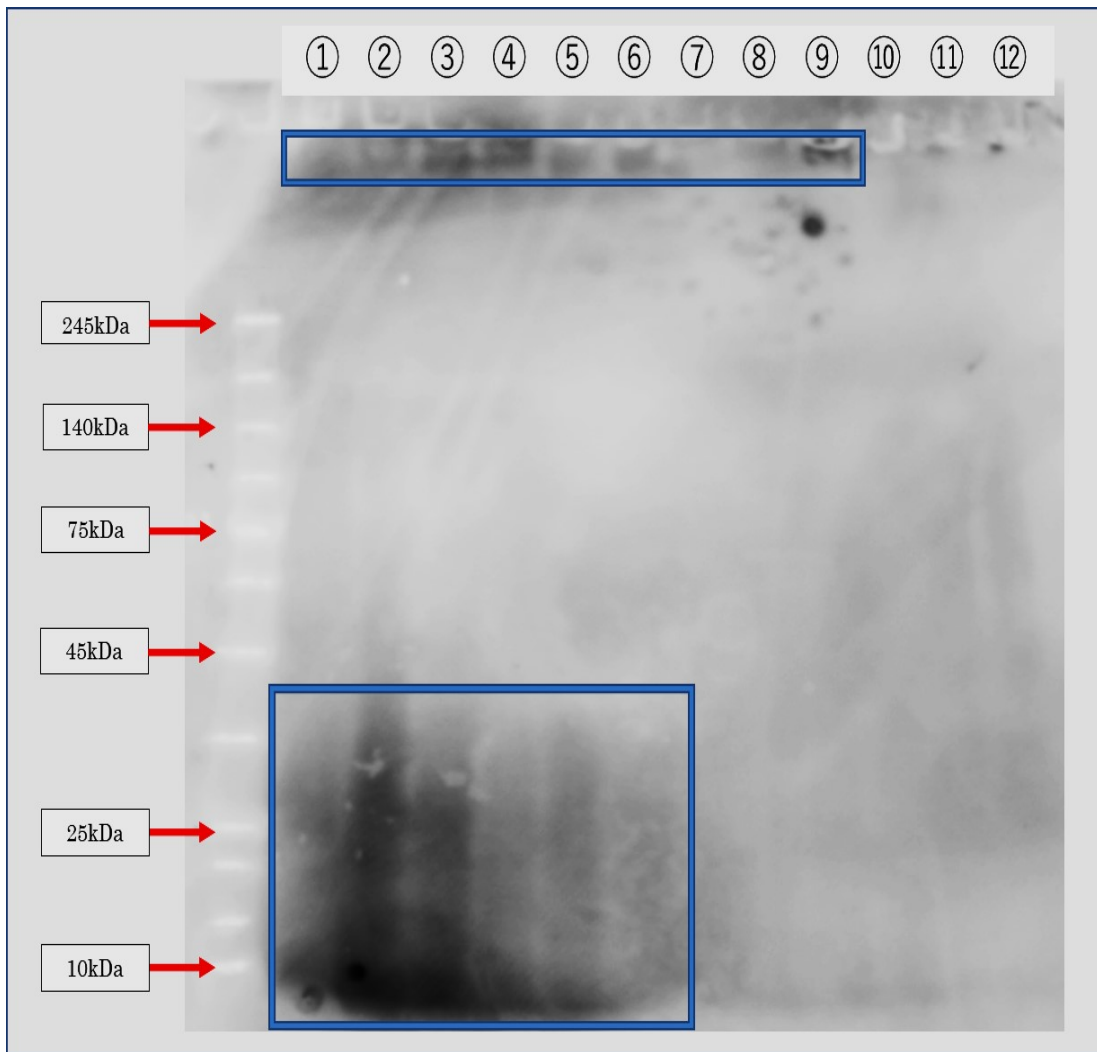


Fig.3-3-36 水溶性 Fibrillin の Western blot

FBN-411~419 では 400kDa 付近の高い分子量の範囲で反応があった。また、FBN-411~416 ではそれ以下の 45~10kDa 付近でも反応が見られた。(Fig.3-3-36)

3-3-9 分光蛍光光度計による測定

F-2000 形分光蛍光光度計 (HITACHI) の未知試料の最適励起波長を測定するためのプリスキャンモードを用いて、水溶性 Fibrillin と水溶性 Elastin の最適励起波長を測定した。1% 水溶性 Fibrillin 水溶液を作製し、最適励起波長を測定後、蛍光波長分布を測定した。また、比較のため水溶性 Elastin 水溶液も同様にして測定した。

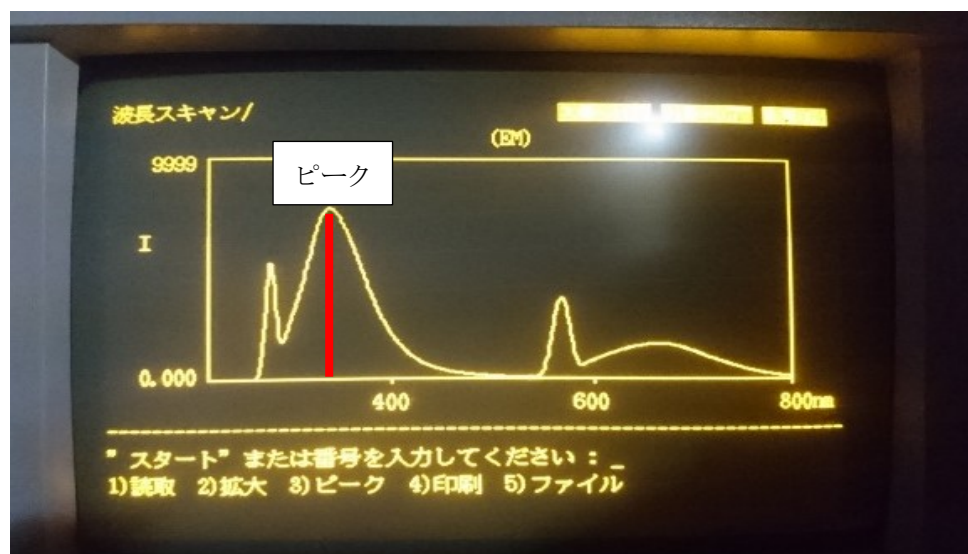


Table.3-3-8 Fibrillin・Elastin の最適励起波長 (A) とピーク値の蛍光波長 (B)

(A)			(B)		
No	FBN-41	PE41	No	FBN-41	PE41
1	294	316	1	362	393
2	296	301	2	345	392
3	298	332	3	348	404
4	297	335	4	346	412
5	303	343	5	358	418
6	297	341	6	353	415
7	312	339	7	403	413
8	347	339	8	423	411
9	347	340	9	433	411
10	346	341	10	417	414
11	345	339	11	417	412
12	341	340	12	411	412

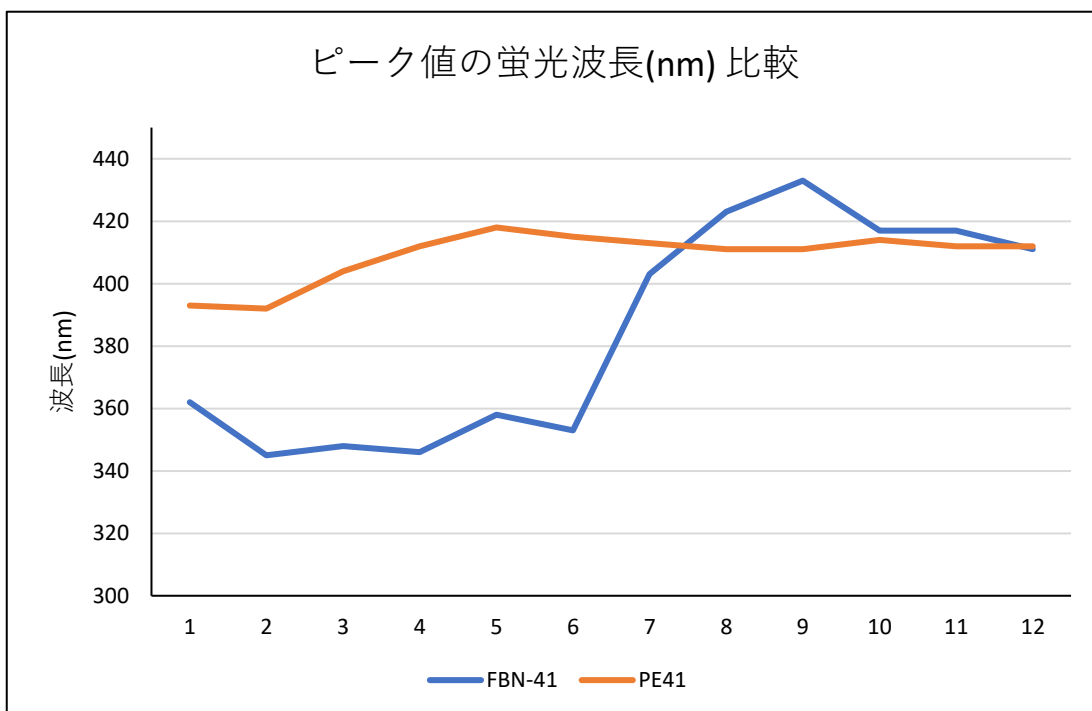
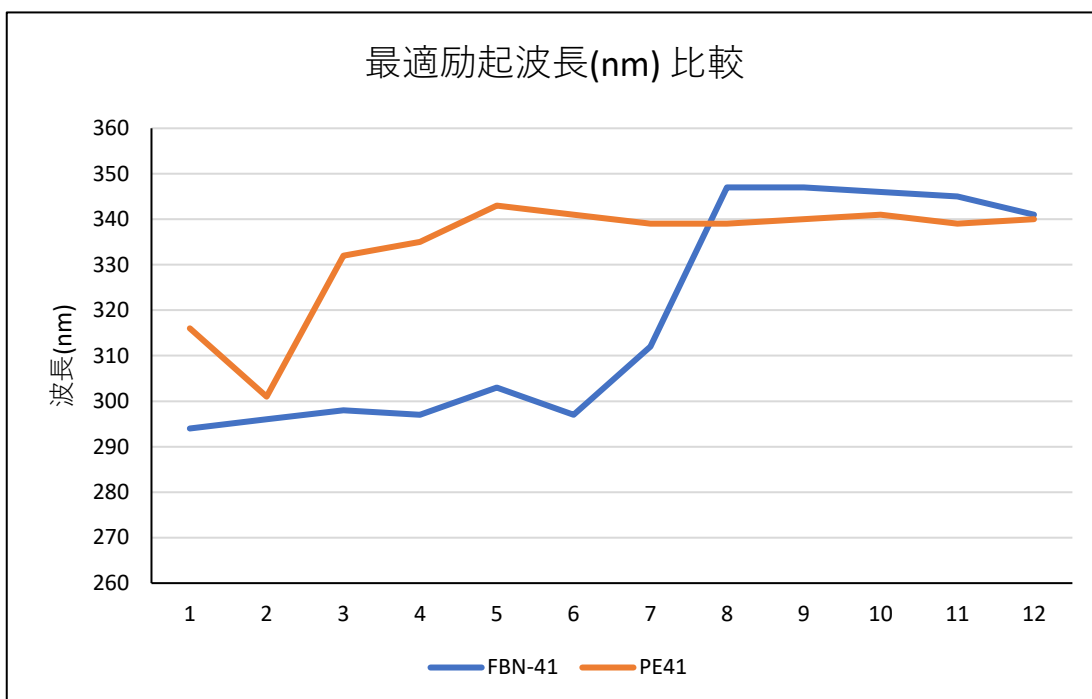


Fig.3-3-37 各 No 毎の Fibrillin と Elastin の最適励起波長とピーク値の蛍光波長

FBN-411~417 の水溶性 Fibrillin は水溶性 Elastin よりも最適励起波長とピーク値をとるときの蛍光波長が大きかった。8 以降の No で最適励起波長とピーク値をとるときの蛍光波長が大きくなり、水溶性 Fibrillin の方が高くなった。(Fig.3-3-37)

また、最適励起波長とピーク値の蛍光波長の濃度依存を確認するために、水溶性 Fibrillin (FBN-414) と水溶性 Elastin (PE41-10) の 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8%, 10% 水溶液を作製し、最適励起波長および蛍光波長を測定した。最適励起波長及びピーク値の蛍光波長は Table3-3-9 に示した。

Table.3-3-9 各サンプルの濃度別最適励起波長とピーク値の蛍光波長

FBN-414	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	1%	2%	3%	4%	6%	8%	10%
最適励起波長	279	284	286	294	298	304	310	356	362	372	374
ピーク値の 蛍光波長	340	341	341	342	346	358	403	439	443	453	457
ピーク値	5575	9999 以上	9999 以上	9999 以上	9999 以上	6524	4355	8883	9789	9172	8775

PE41-10	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	1%	2%	3%	4%	6%	8%	10%
最適励起波長	332	333	335	336	341	342	343	359	368	373	378
ピーク値の 蛍光波長	404	409	409	411	415	415	428	439	445	455	463
ピーク値	251.7	1177	2235	6723	9999 以上	9999 以上	9999 以上	8431	8075	7787	6271

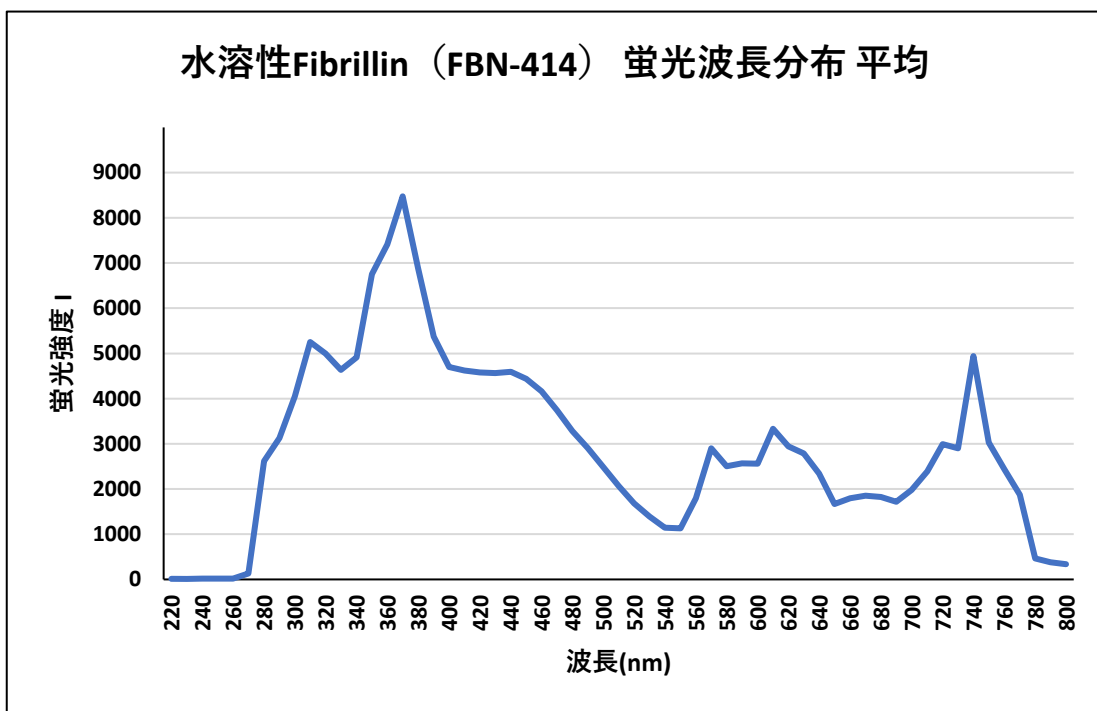
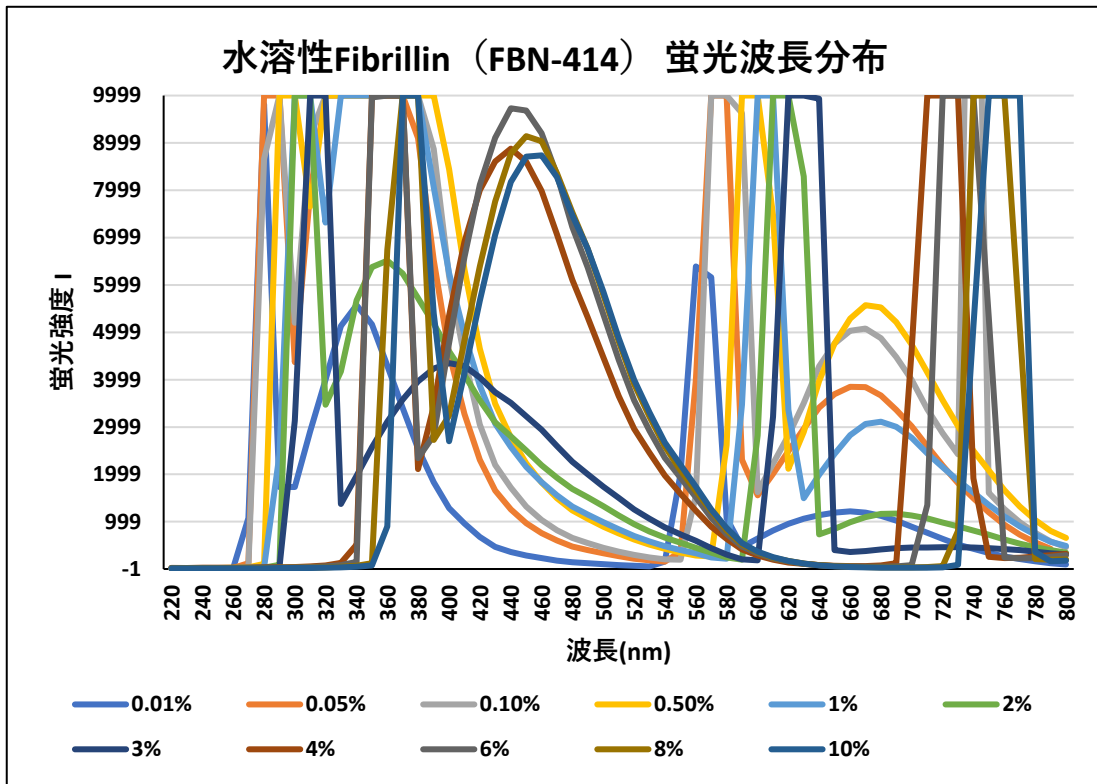


Fig.3-3-38 異なる濃度の水溶性 Fibrillin の蛍光波長分布

溶液の濃度が高くなるほど蛍光波長は高波長側にシフトしていた。(Fig.3-3-38)

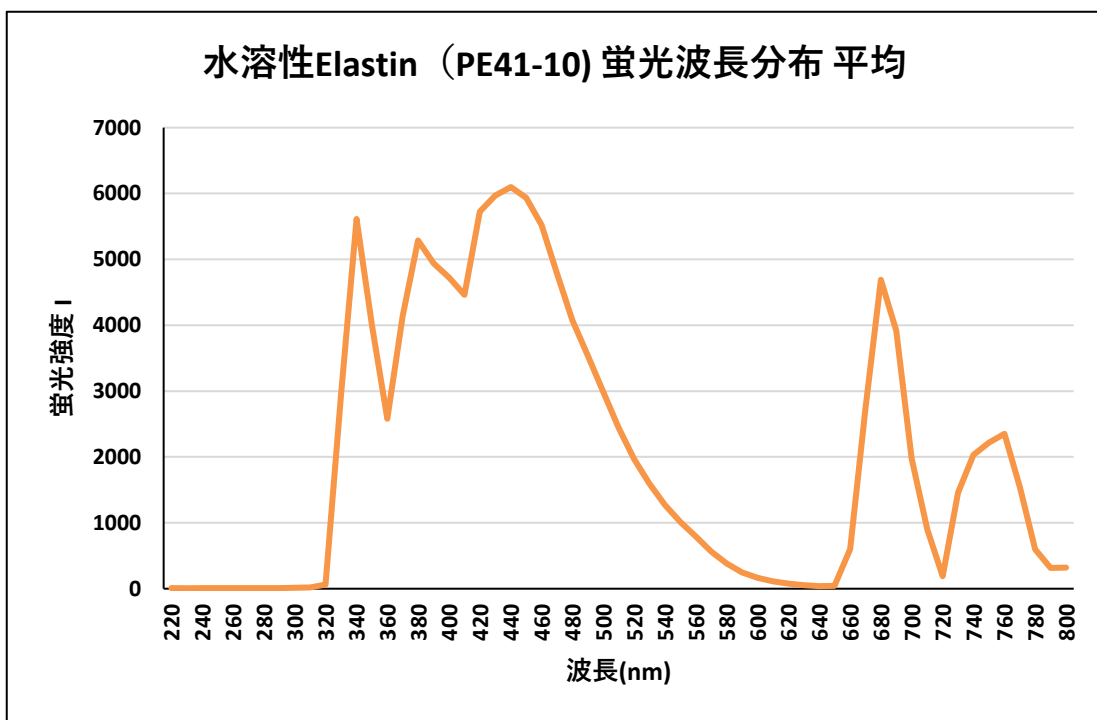
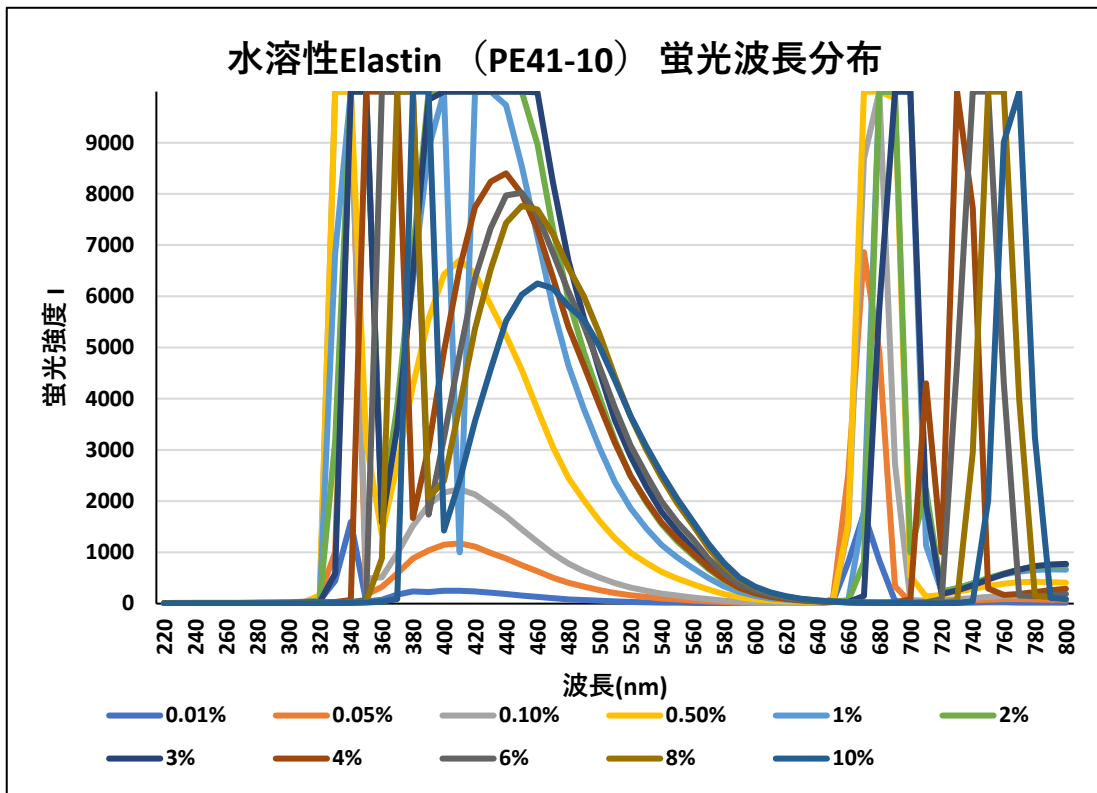


Fig.3-3-39 異なる濃度の水溶性 Elastin の蛍光波長分布

溶液の濃度が高くなるほど蛍光波長は高波長側にシフトしていた。(Fig.3-3-39)

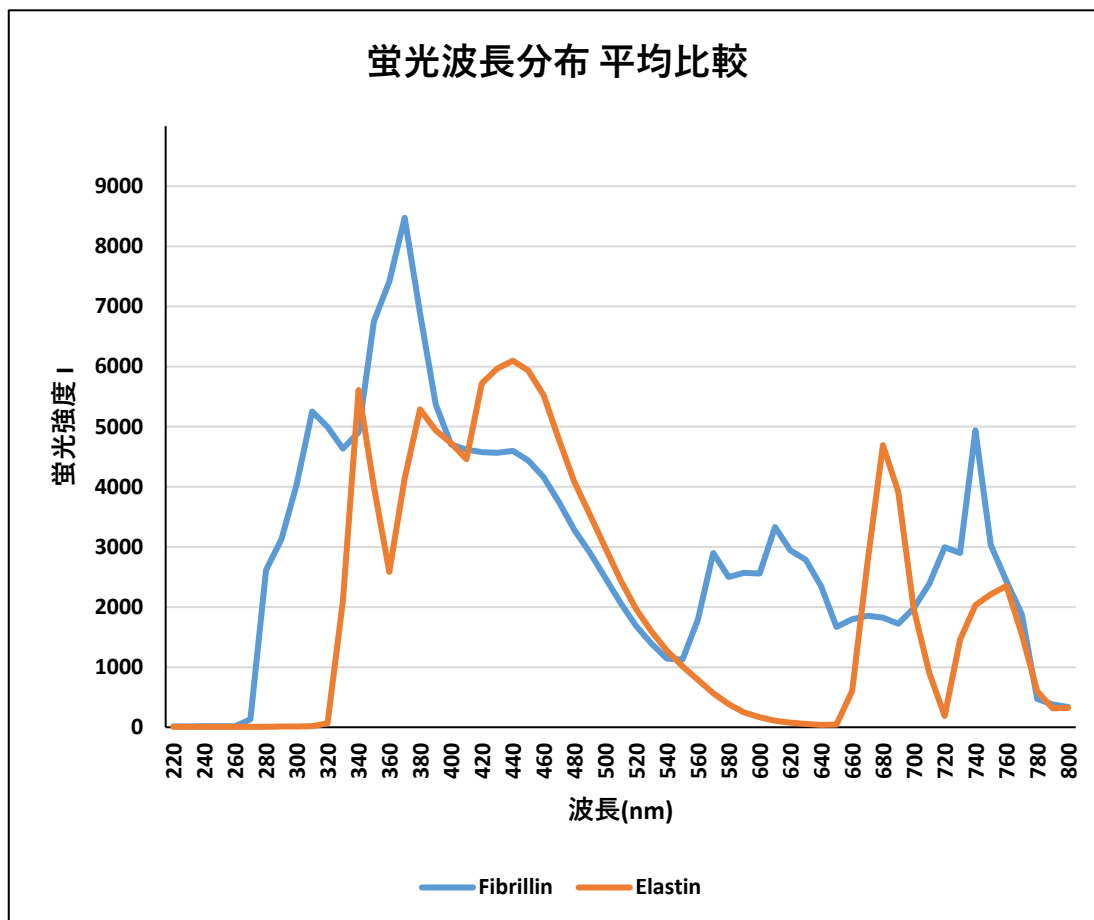


Fig.3-3-40 異なる濃度の水溶性 Fibrillin・Elastin 蛍光波長平均比較

水溶性 Fibrillin と水溶性 Elastin の蛍光波長分布を比較すると、水溶性 Fibrillin は 360-380 付近でピーク値があり、水溶性 Elastin は 420-460 付近でピーク値があった。(Fig.3-3-40) 水溶性 Fibrillin と水溶性 Elastin の蛍光波長分布は異なっている。

水溶性 Fibrillin と水溶性 Elastin は濃度依存的に最適励起波長とピーク値の蛍光波長が変化することが分かった。以上の結果を用いて、ゲル作製時の濃度 = 40%の状態での最適励起波長とピーク値の蛍光波長を推定した。Table.3-3-9 の値をプロットし線形近似曲線を引いた。また、Fibrillin は直線性が見られる 4%~10% の範囲で線形近似曲線を引いた。

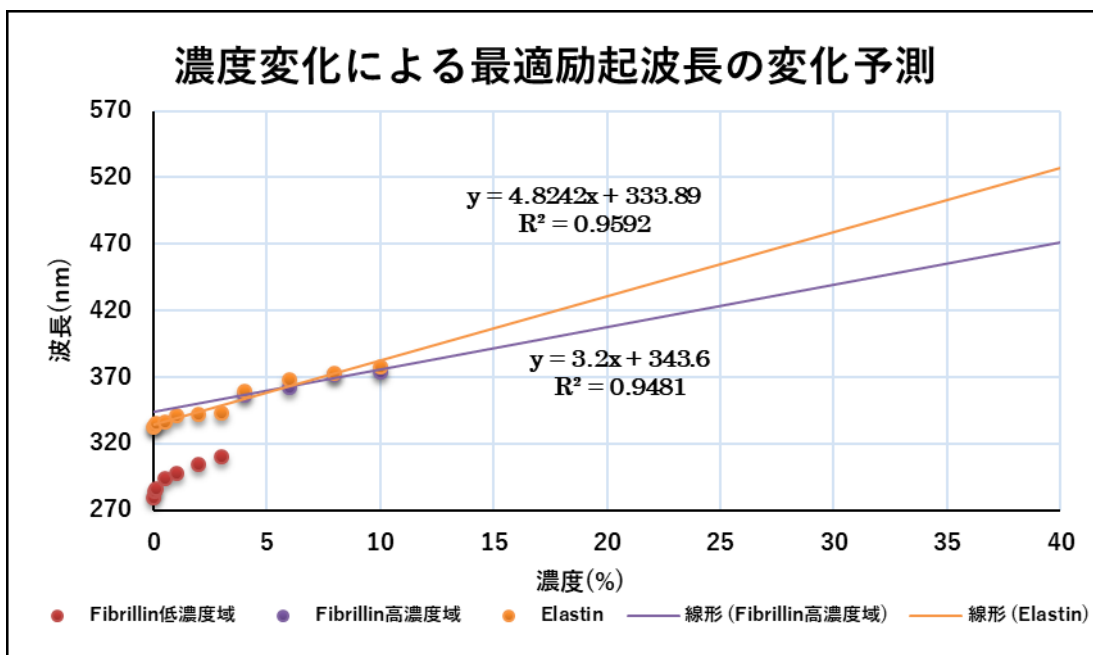


Fig.3-3-41 最適励起波長の濃度依存による変化予測

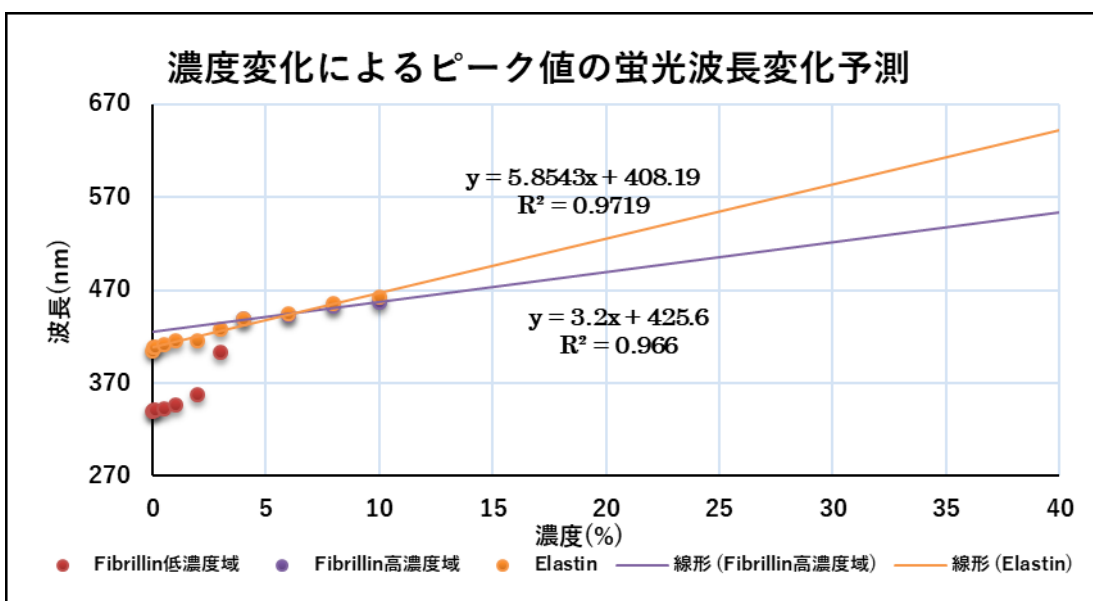


Fig.3-3-42 ピーク値の蛍光波長の濃度依存による変化予測

Fig.3-3-41,42 で求めたタンパク濃度が 40%水溶液時の推測値は最適励起波長が Fibrillin=471.6nm、Elastin=526.858nm であり、ピーク値の蛍光波長は Fibrillin=553.6nm、Elastin=642.362nm だった。共焦点レーザー顕微鏡でのタンパク濃度 40%ゲル観察時の励起波長とピーク値の蛍光波長は励起波長：Fibrillin=405nm、Elastin=488nm、ピーク値の蛍光波長：Fibrillin=406nm、Elastin=520nm である。実測値と推測値で誤差はあるが同じ傾向を示した。

3-3-10 水溶性 Fibrillin コーティングシャーレの接触角測定

コロナ放電を行い、水溶性 Fibrillin をコーティングしたシャーレの接触角を測定した。各 No ごとの接触角は Fig.3-3-43 に示した。

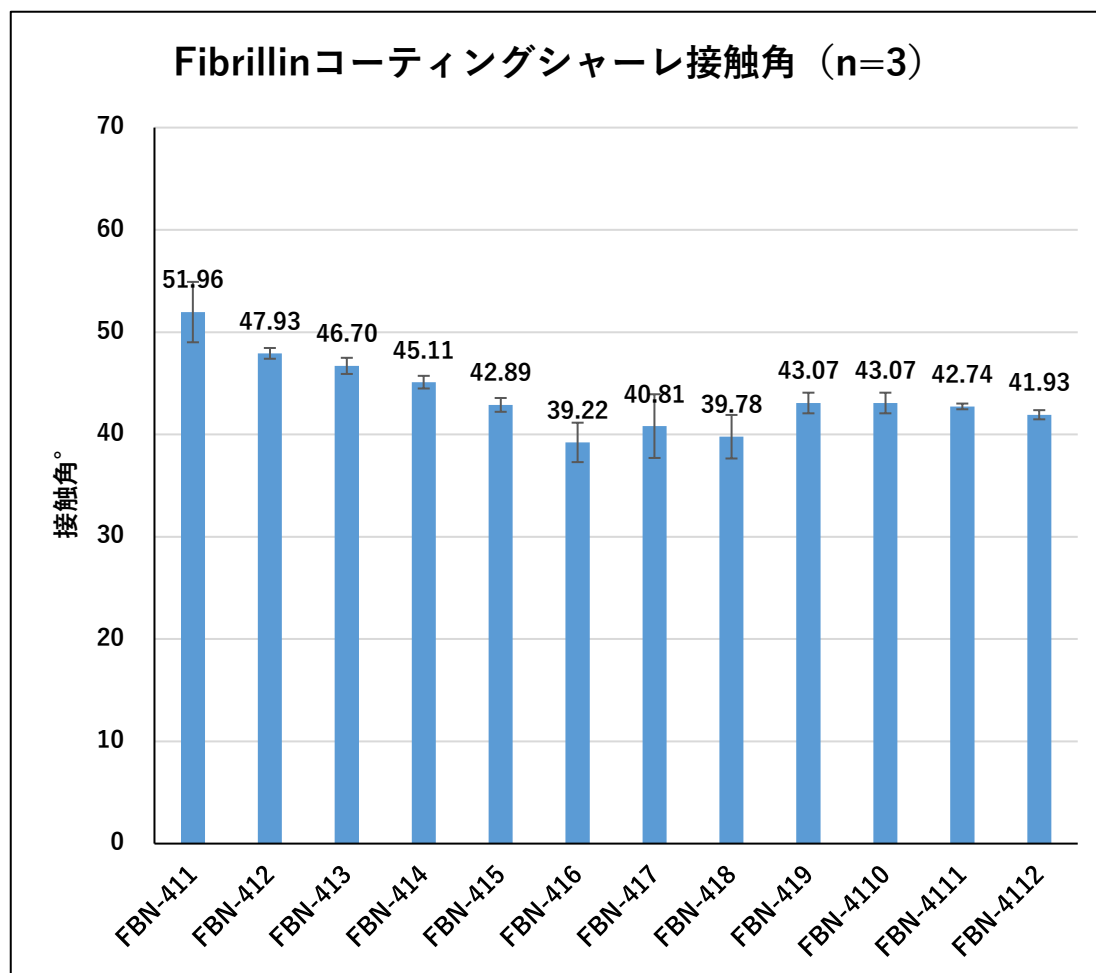


Fig.3-3-43 水溶性 Fibrillin コーティングシャーレの接触角

FBN-411~416のサンプルでは接触角は小さくなっていき、FBN-417からは接触角が再び大きくなる傾向であった。(Fig.3-3-43)

3-3-11 Nuclear magnetic resonance (NMR)

アミノ酸分析の結果より抽出した水溶性 Fibrillin の Cysteine の値は理論値より大きく下回っていた。この原因を調査するため、アミノ酸をシュウ酸で加熱することで抽出過程を再現した。熱シュウ酸後のサンプルを NMR で測定し、分解が起こっているかを確認した。(5%, 10%水溶液に関してはサンプル量不足により一部測定できなかった。)

L-Cystine シュウ酸水溶液 非加熱

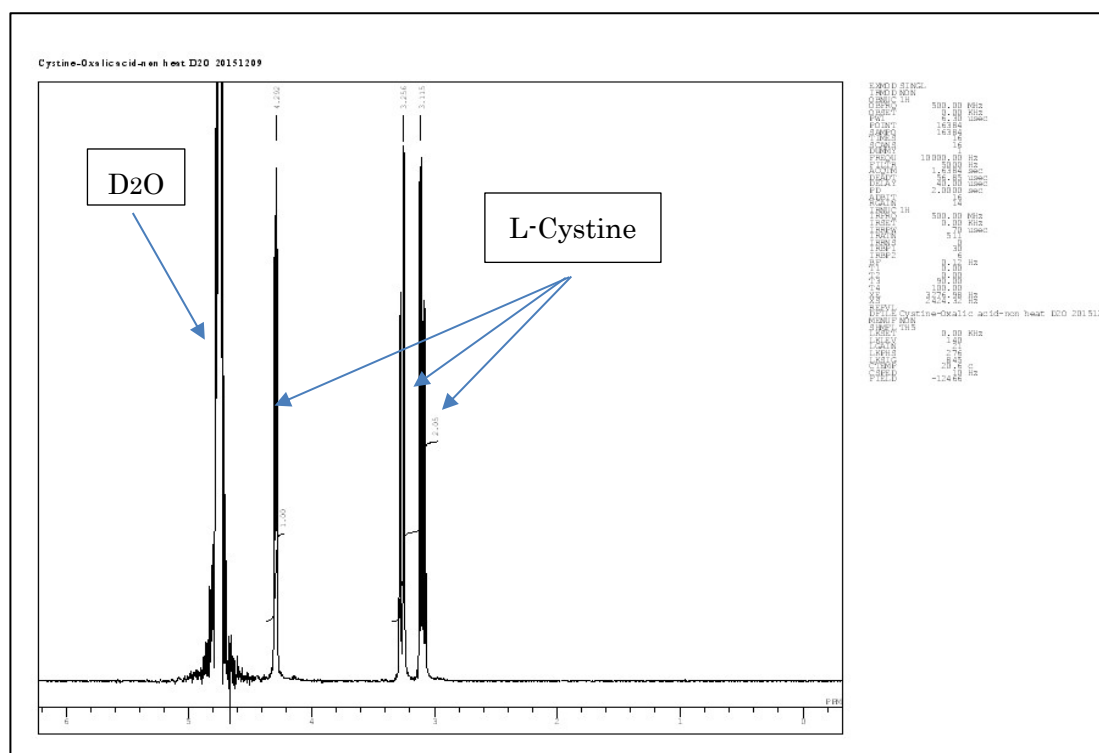
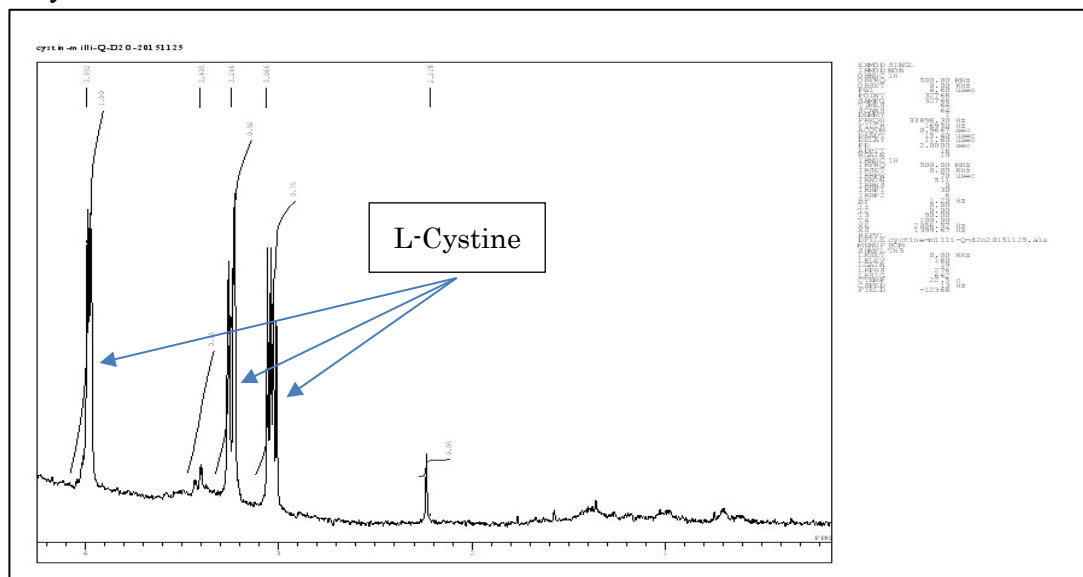


Fig.3-3-44 L-Cystine 非加熱 NMR 測定結果

L-Cystine をシュウ酸水溶液に溶解させるだけでは L-Cystine の peak しか確認できなかつた。(Fig.3-3-44)

L-Cystine 脱イオン水 加熱



L-Cystine シュウ酸水溶液 加熱

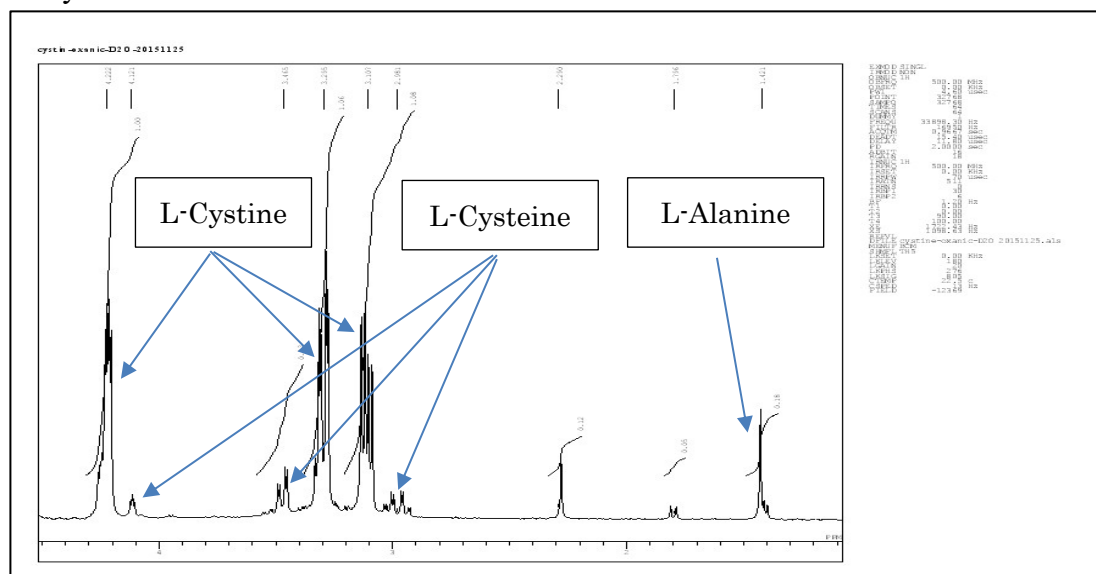


Fig.3-3-45 L-Cystine 加熱後 NMR 測定結果

L-Cystine を脱イオン水で加熱したものに変化は見られなかった。シュウ酸水溶液で加熱したものは Cysteine や Alanine と思われる peak が確認できた。(Fig.3-3-45)

L-Cysteine と L-Aspartic acid についても同様の実験を行ったが脱イオン水で加熱したもの、シュウ酸水溶液で加熱したものに変化は見られなかった。

3-3-12 水溶性 Fibrillin の粘度測定

1%, 5%, 10% Fibrillin 水溶液 (FBN-411~4112) を作製後、コーンプレート型粘度計 DV-II+Pro (BROOKFIELD) のサンプルカップに 500 μ l 添加した。粘度計の回転数を 100、150、200rpm に設定し、10 $^{\circ}$ C における粘度を測定した。

1% Fibrillin 水溶液

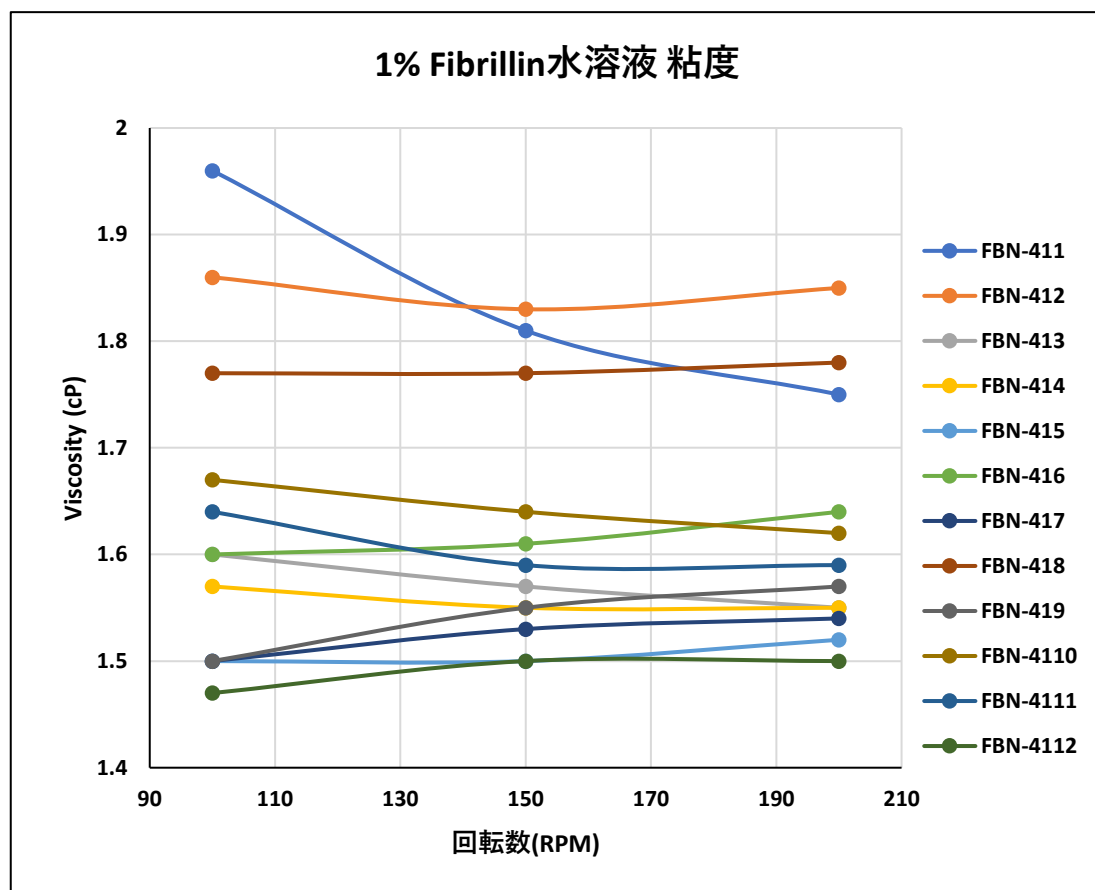


Fig.3-3-46 1% Fibrillin 水溶液粘度

No が大きくなるにつれて粘度は小さくなる傾向であった。(Fig.3-3-46)

5% Fibrillin 水溶液

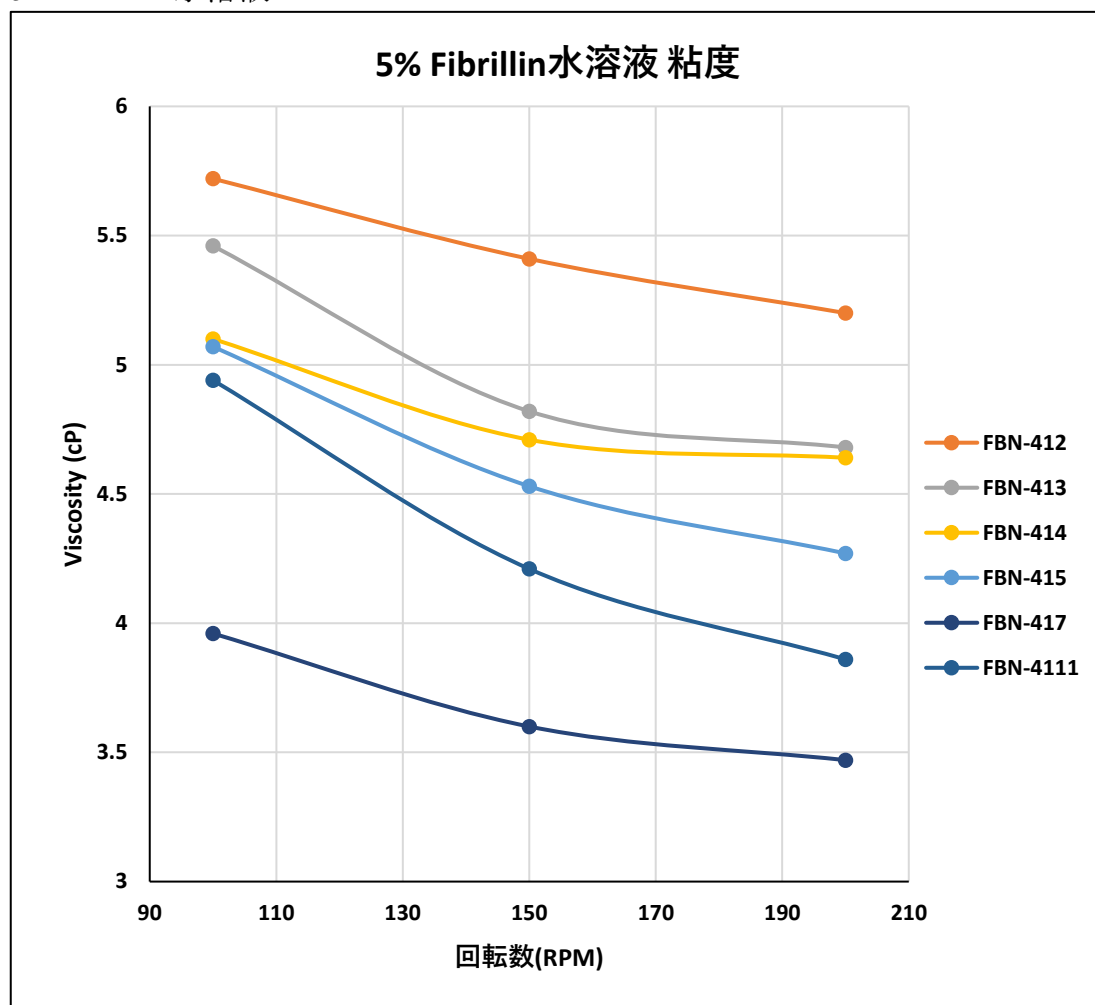


Fig.3-3-47 5% Fibrillin 水溶液粘度

No が大きくなるにつれて粘度は小さくなる傾向であった。(Fig.3-3-47)

10% Fibrillin 水溶液

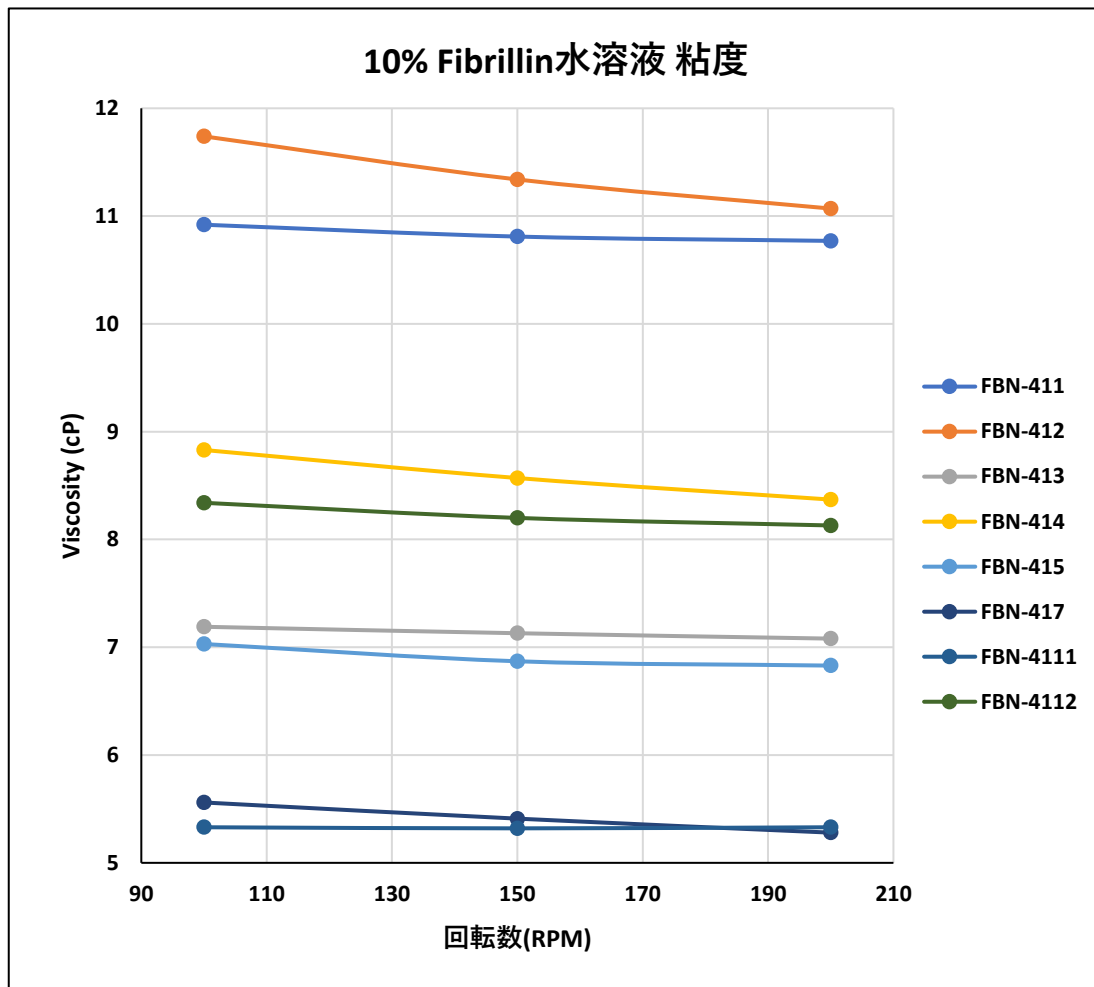


Fig.3-3-48 10% Fibrillin 水溶液粘度

No が大きくなるにつれて粘度は小さくなる傾向であった。(Fig.3-3-48)

3-3-13 水溶性 Fibrillin のクロマトグラフィー

作製した水溶性 Fibrillin を PBS(0.1M NaCl を含む)に溶解し、インジェクターに 20 μ l 注入して、カラム(TGK-G4000SW)に流した(流速: 1ml/ min)。UV 280、RI で検出し水溶性 Fibrillin の分子量を測定した。分子量マーカーとして BSA を用いた。(系列 1, 青:UV280、系列 2, 赤:RI)

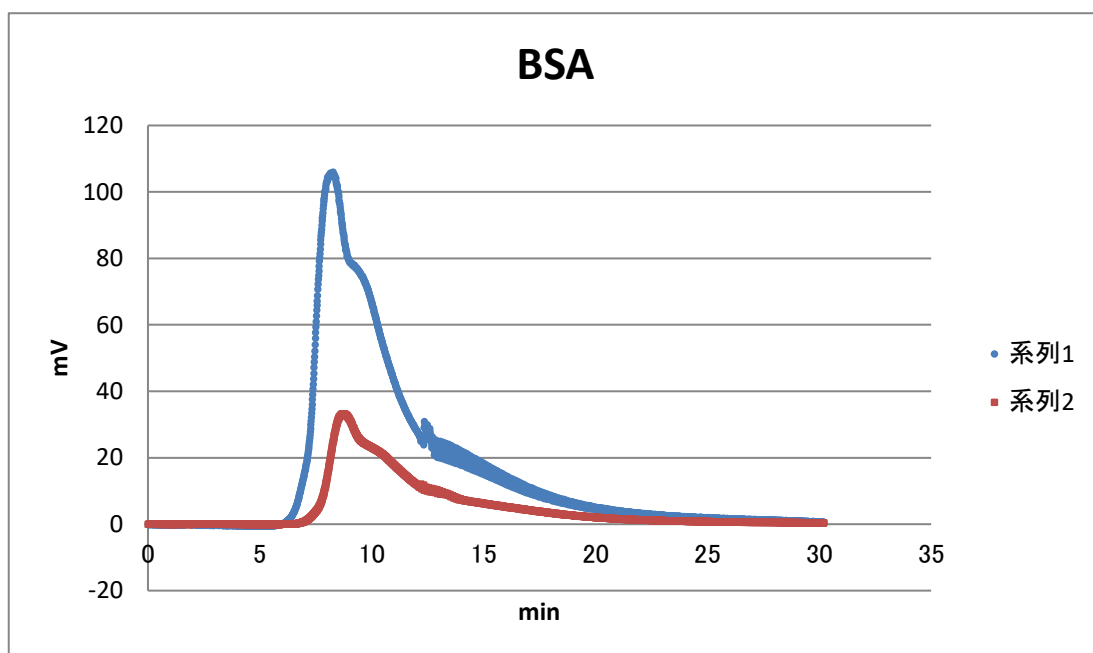


Fig.3-3-49 BSA (分子量マーカー)のクロマトグラフィー(流速が 1ml/min より速い)

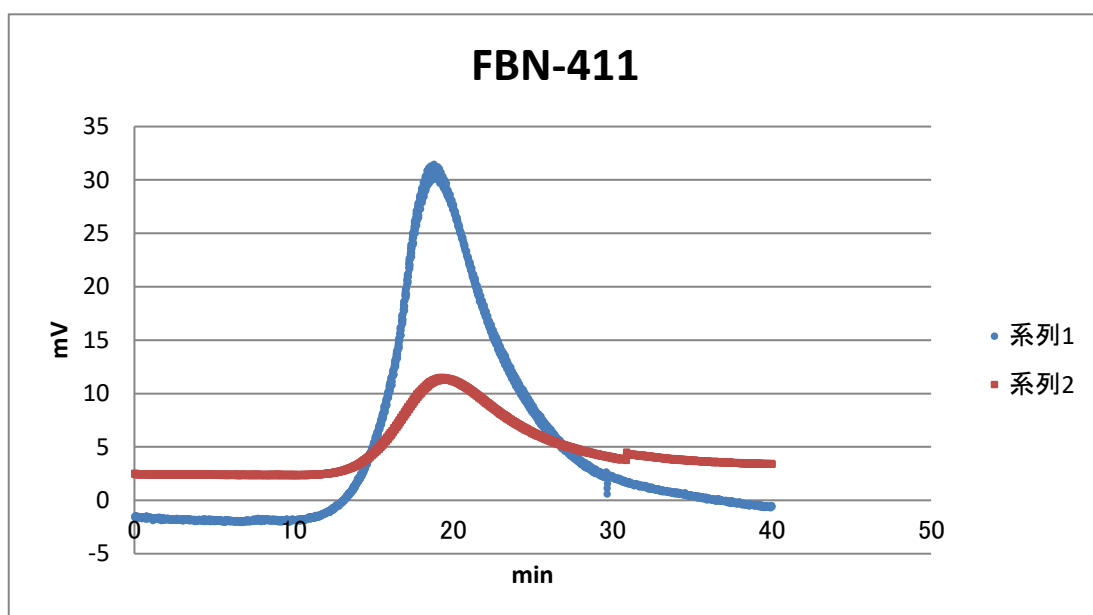


Fig.3-3-50 FBN-411 のクロマトグラフィー

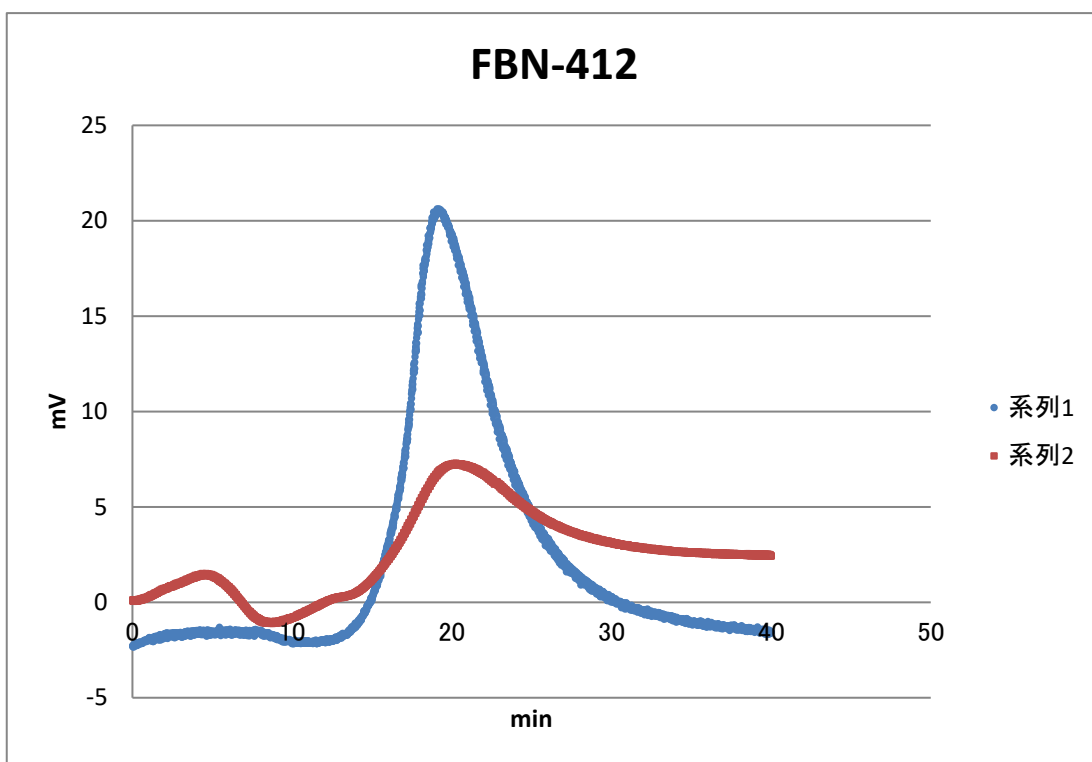


Fig.3-3-51 FBN-412 のクロマトグラフィー

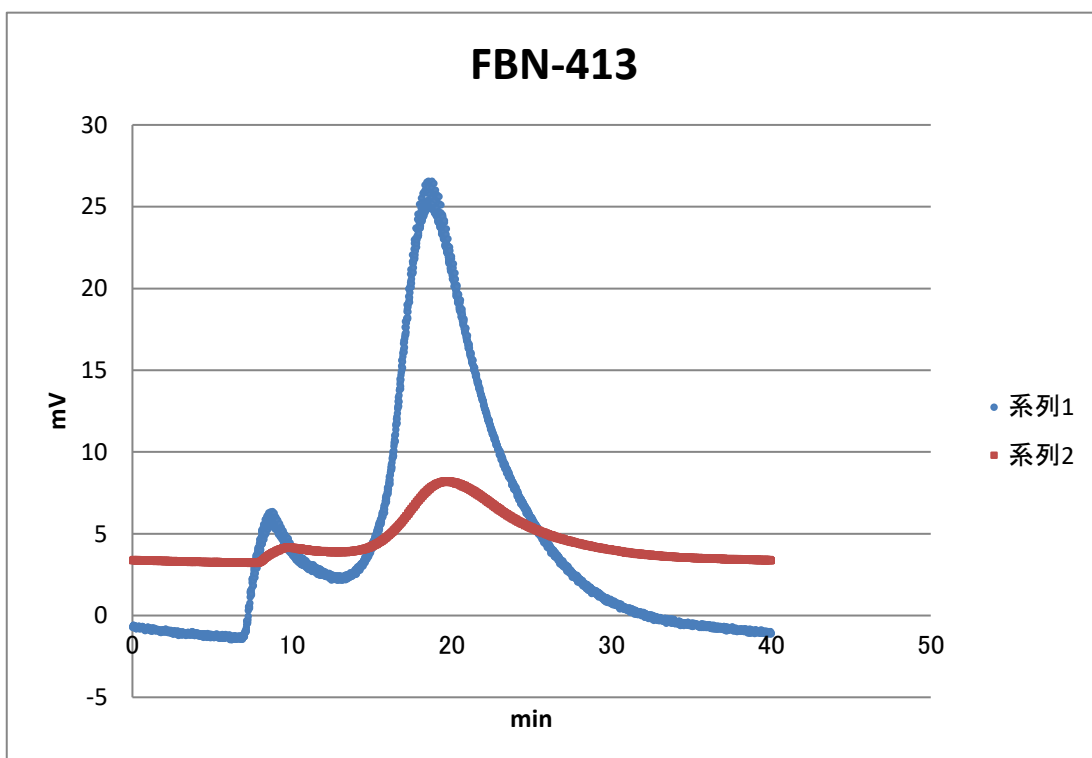


Fig.3-3-53 FBN-413 のクロマトグラフィー

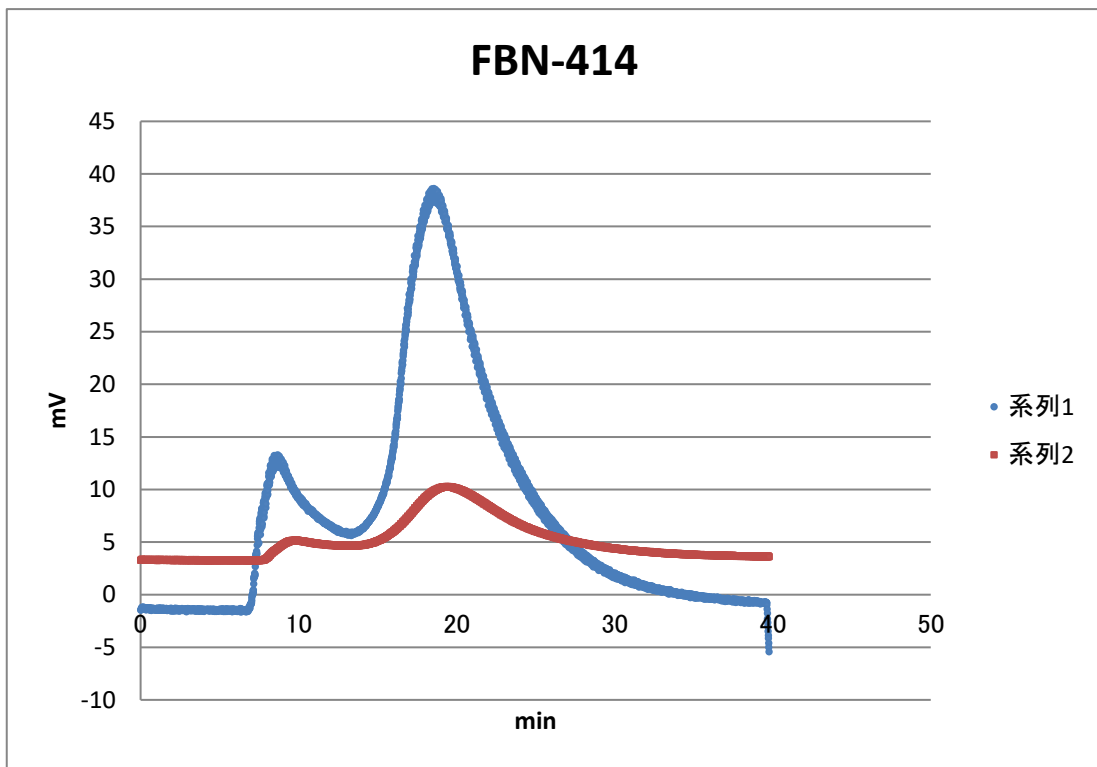


Fig.3-3-54 FBN-414 のクロマトグラフィー

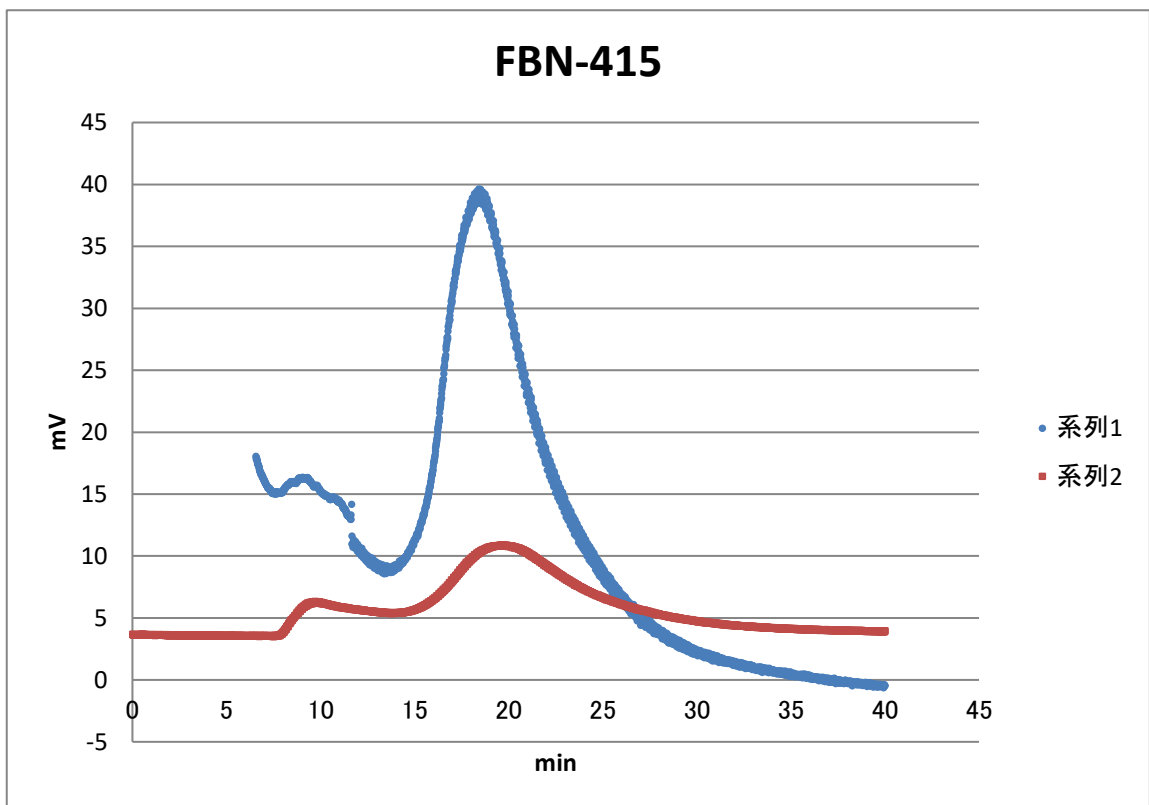


Fig.3-3-55 FBN-415 のクロマトグラフィー

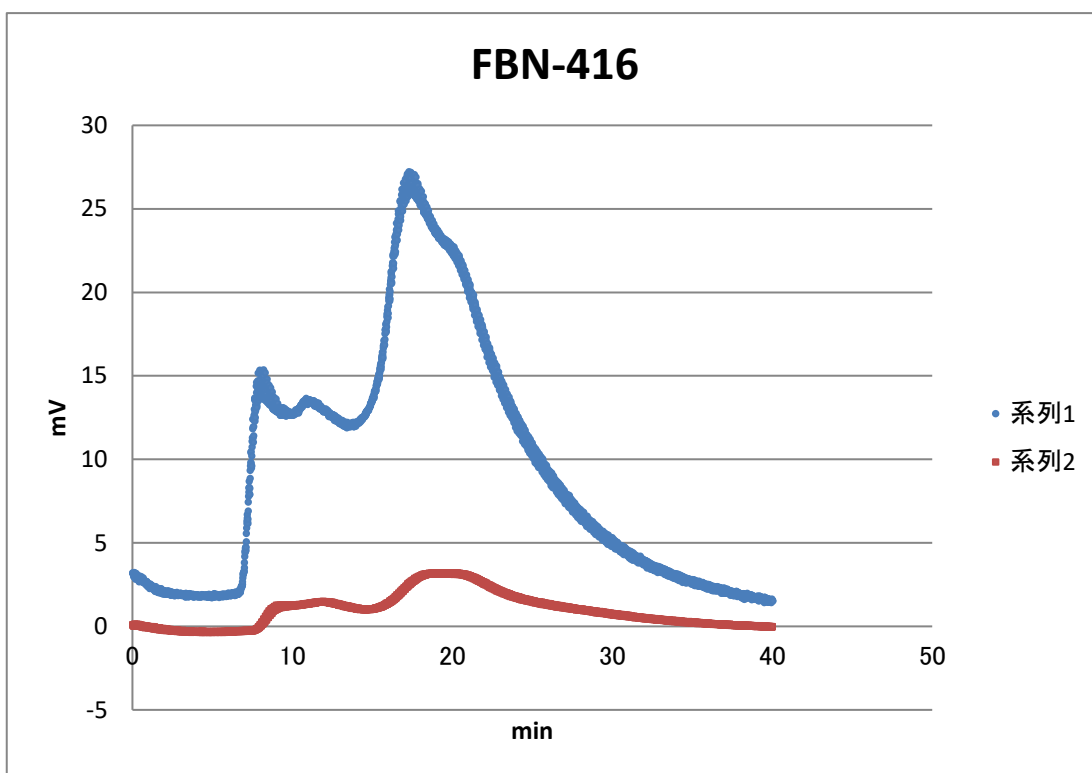


Fig.3-3-56 FBN-416 のクロマトグラフィー

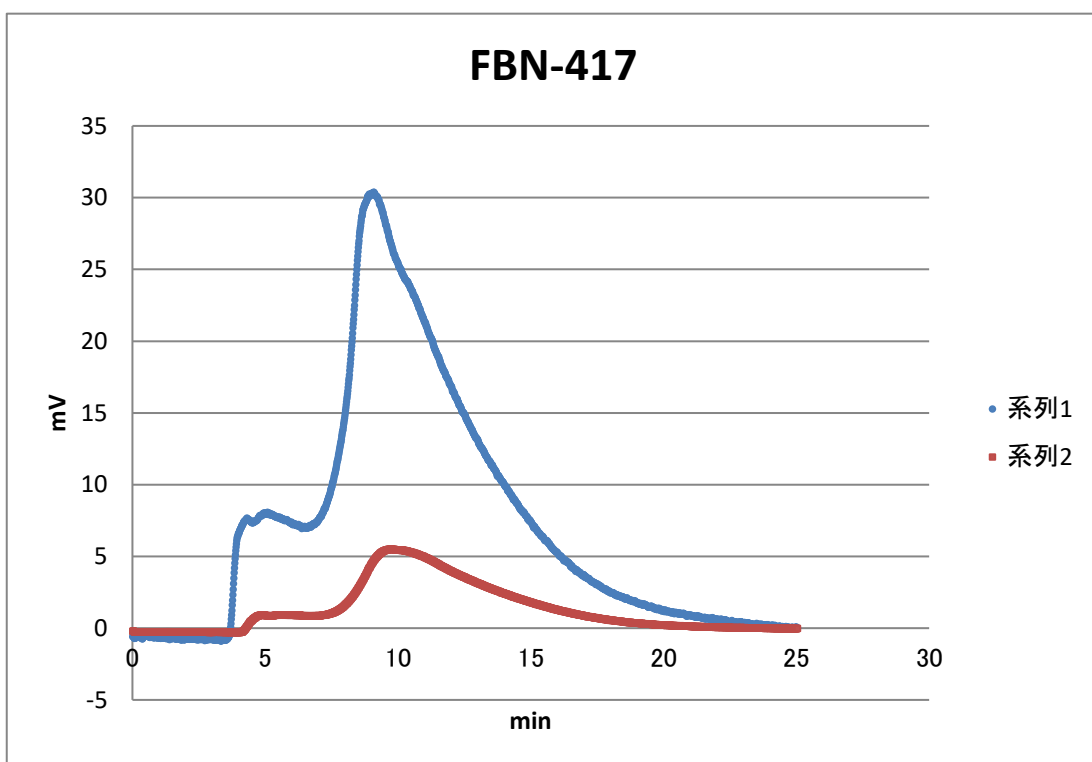


Fig.3-3-57 FBN-417 のクロマトグラフィー (流速が 1ml/min より速い)

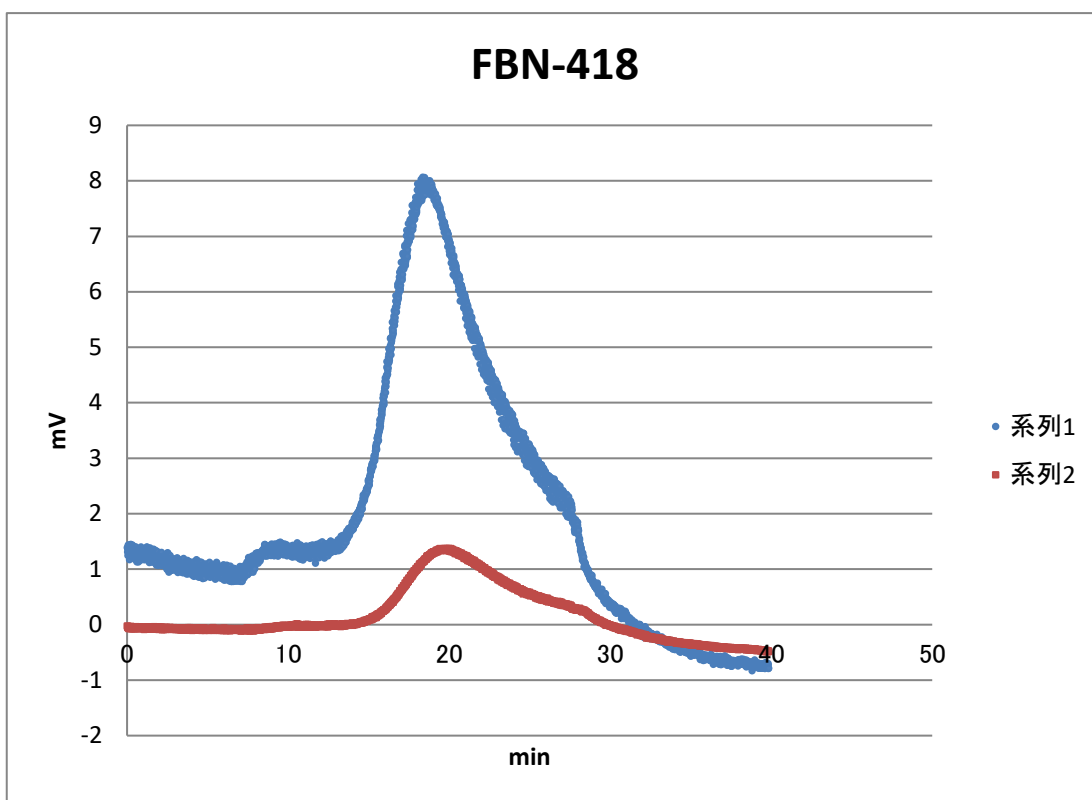


Fig.3-3-58 FBN-418 のクロマトグラフィー

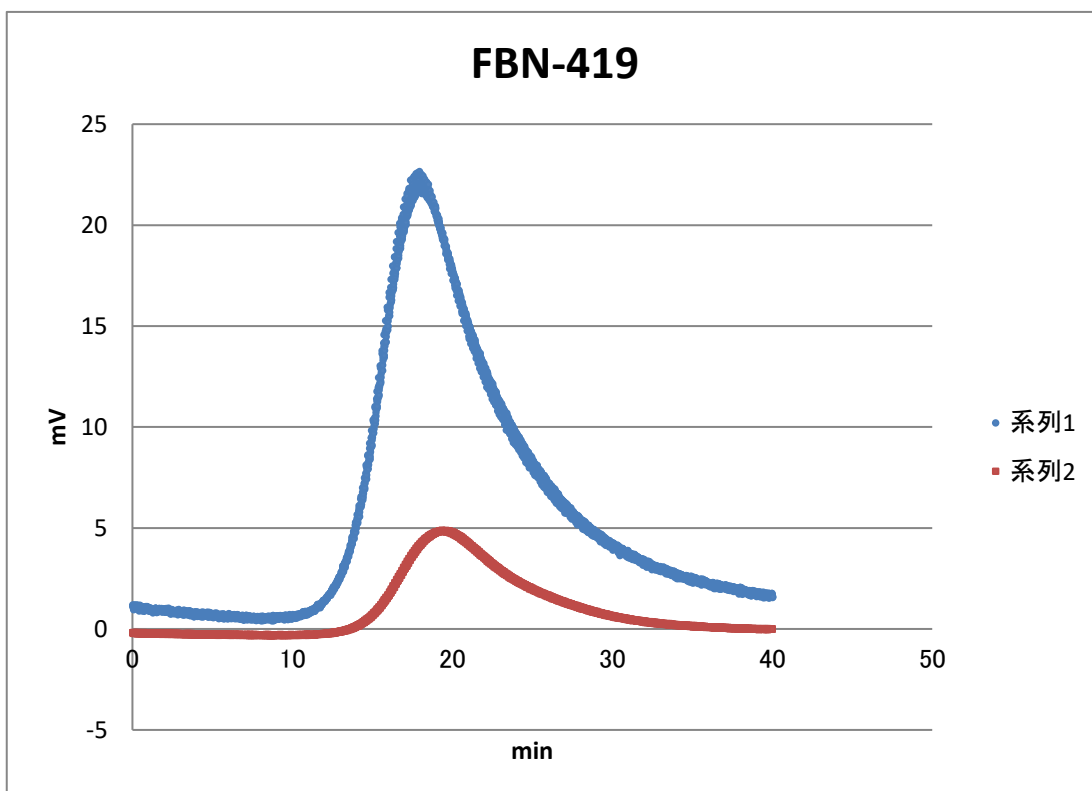


Fig.3-3-59 FBN-419 のクロマトグラフィー

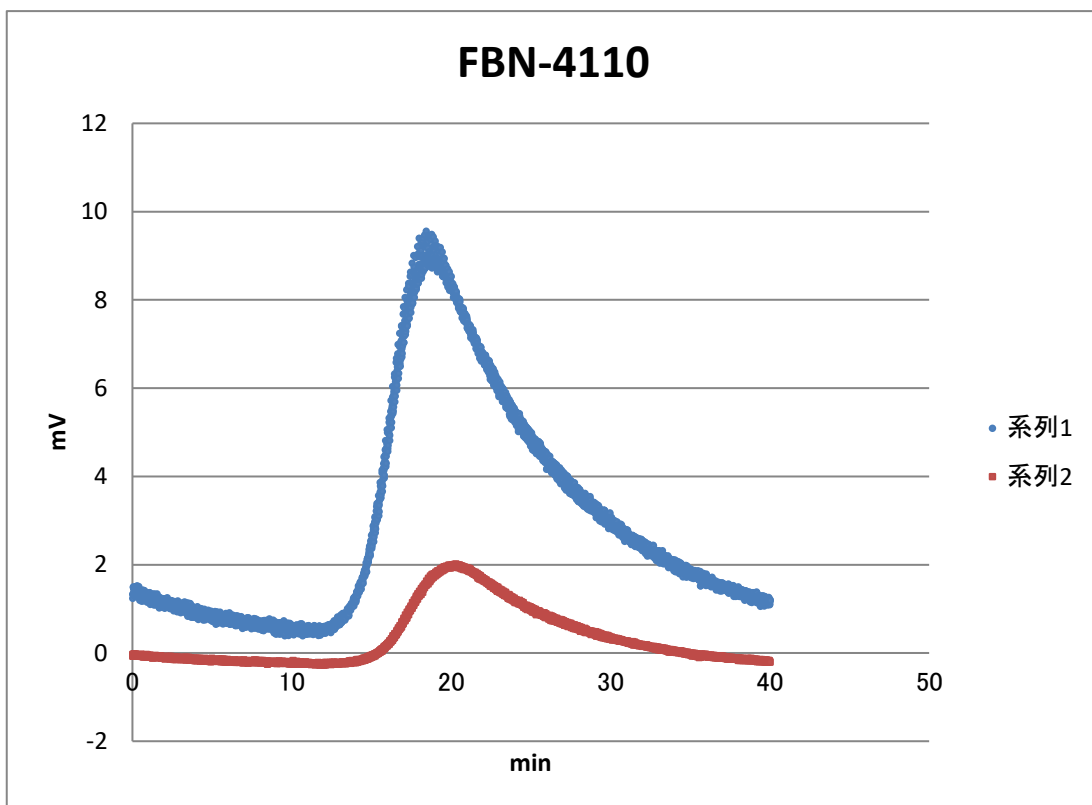


Fig.3-3-60 FBN-4110 のクロマトグラフィー

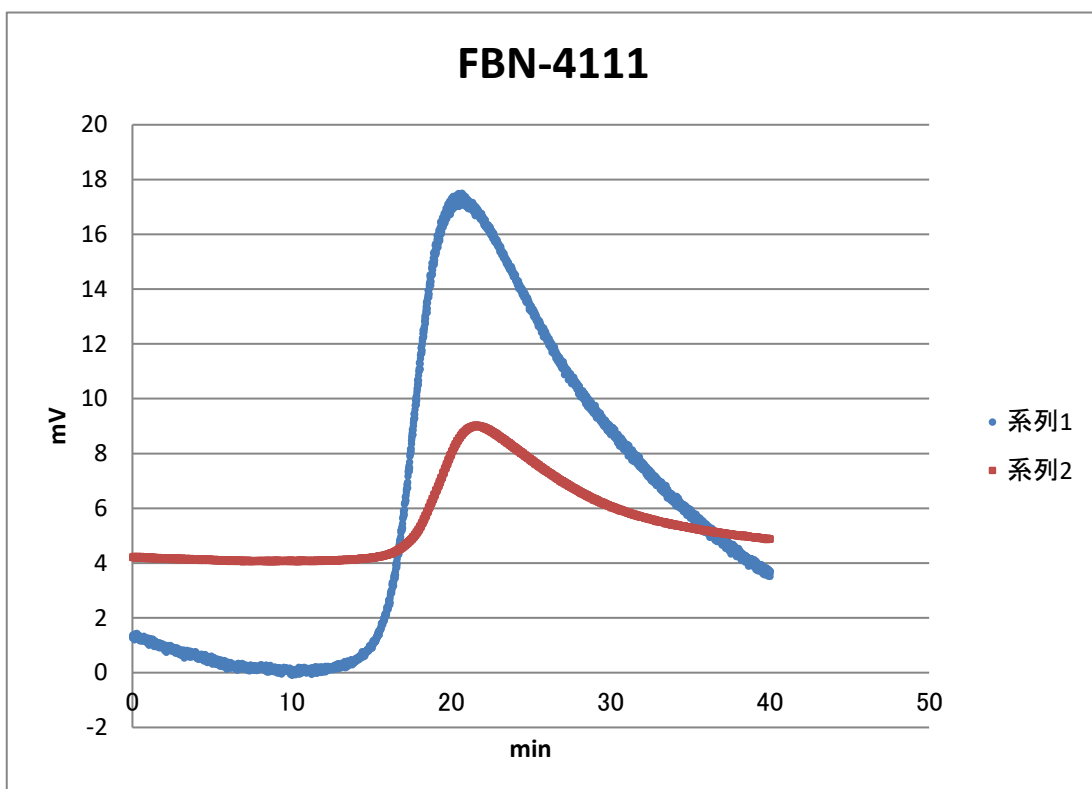


Fig.3-3-61 FBN-4111 のクロマトグラフィー

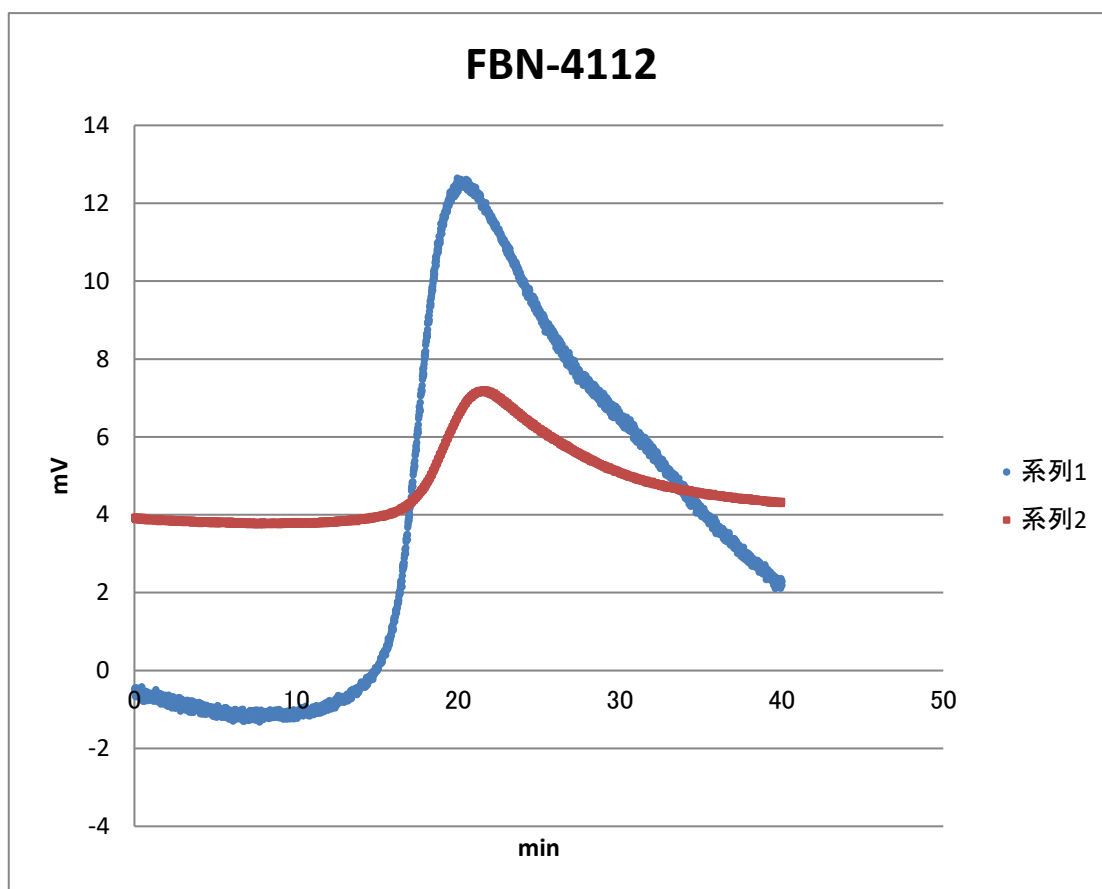


Fig.3-3-62 FBN-4112 のクロマトグラフィー

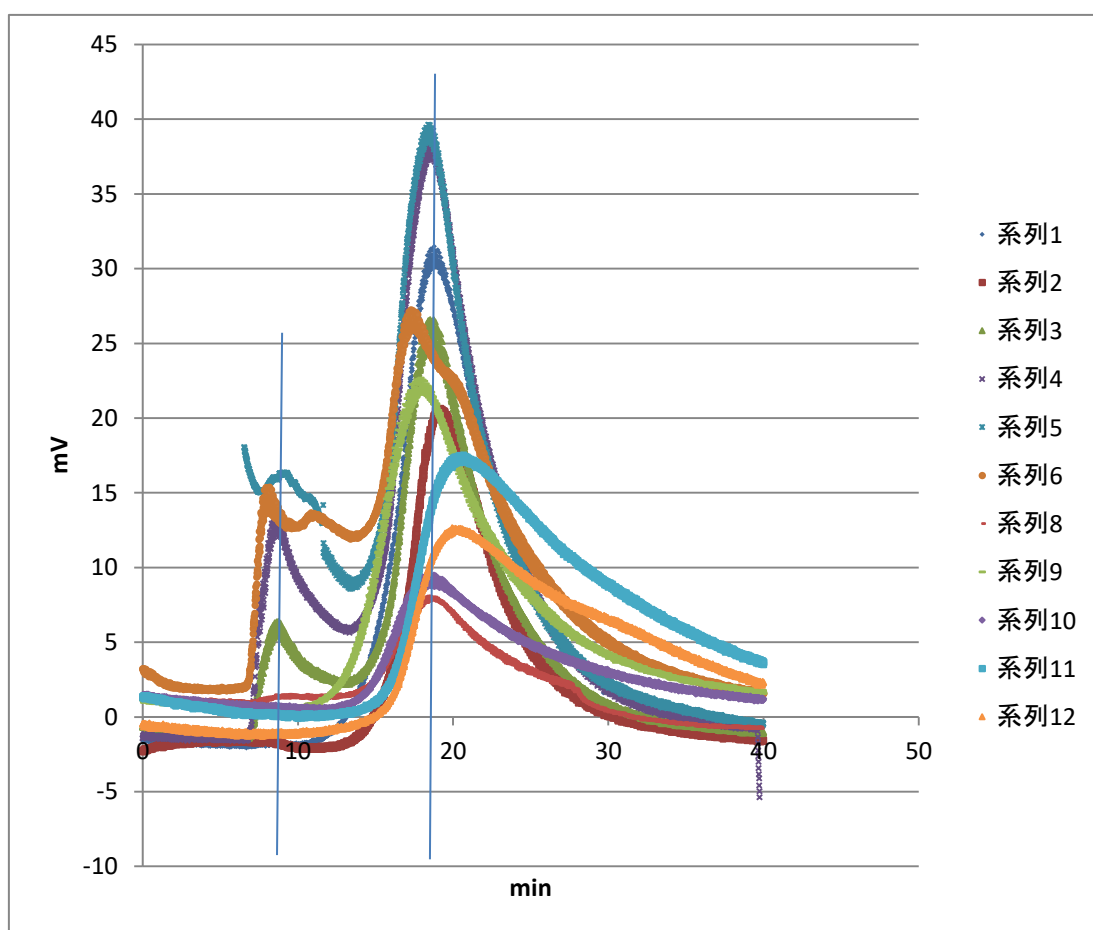


Fig.3-3-63 水溶性 Fibrillin のクロマトグラフィーまとめ
(系列 1～12 は FBN-411～4112 とそれぞれ対応)

FBN-413～418 は分子量マーカーである BSA より早い時間と、BSA より遅い時間の 2 回でピークが検出された。BSA の分子量は約 66kDa であるので FBN-413～418 は 66kDa 以上と 66kDa 以下の 2 つの分子量分布となっていることが分かった。FBN-411,412,419～4112 は BSA より遅い時間でピークが検出されたため、66kDa 以下の分子量分布となっていることが分かった。(Fig.3-3-49～62)

3-3-14 水溶性 Fibrillin の NMR

水溶性 Fibrillin である FBN-413,411 を NMR によって測定した。

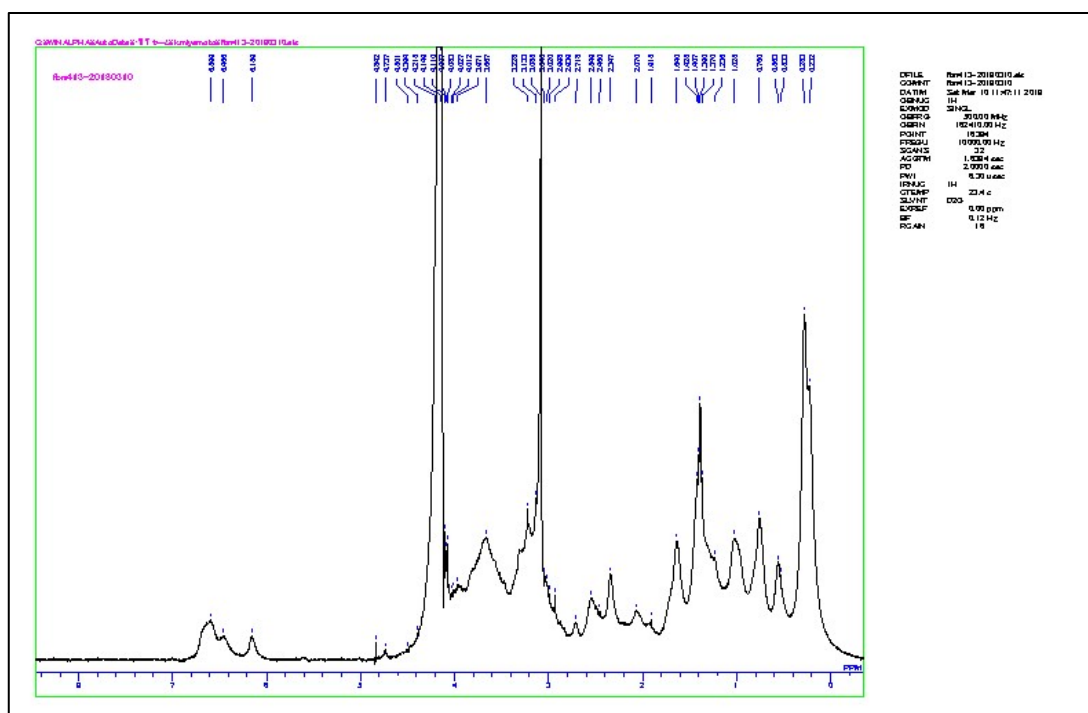


Fig.3-3-64 FBN-413 の NMR

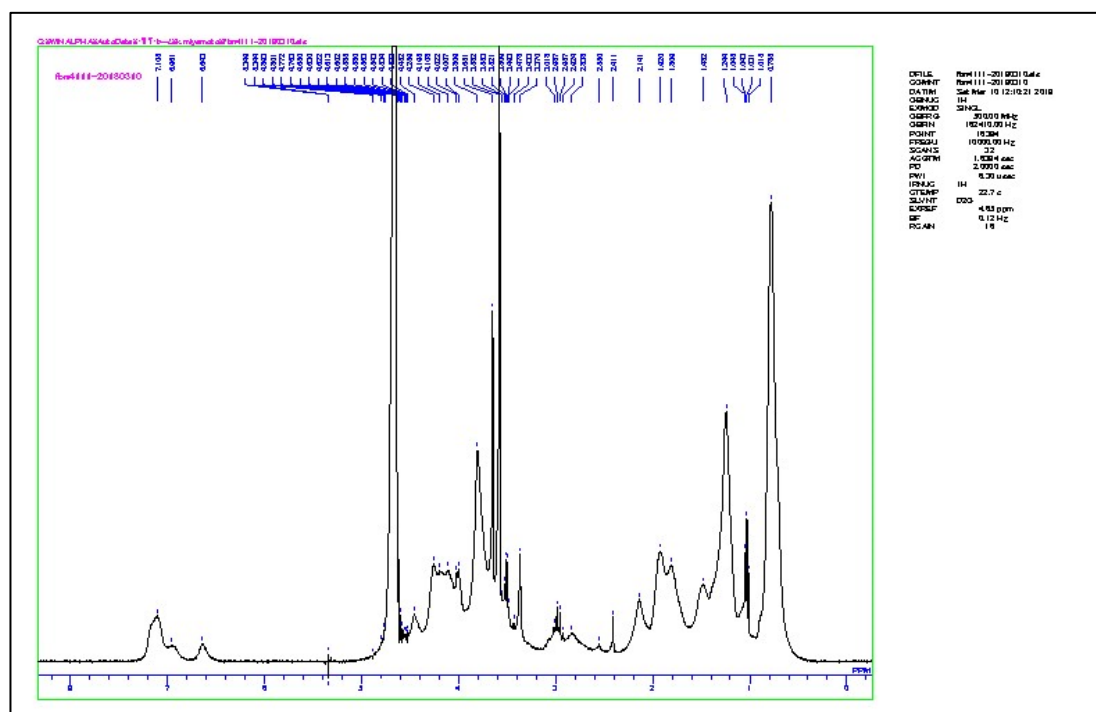
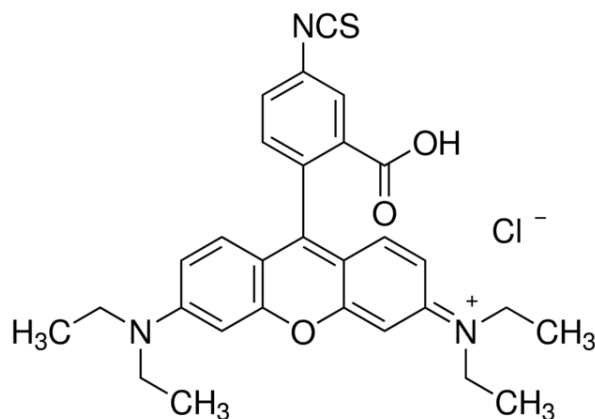


Fig.3-3-65 FBN-4111 の NMR

FBN-413 と FBN-4111 ではピークの分布が異なっていた。(Fig.3-3-64~65)

3-3-15 Rhodamine B isothiocyanate(RBITC)ラベル化 Fibrillin の作製

Rhodamine B isothiocyanate (RBITC)をラベル化した水溶性 Fibrillin を作製後、ゲルを作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。ゲルの作製条件を Table.3-3-10 に示した。ゲルの作製条件を Table.3-3-11 に示した。



Rhodamine B isothiocyanate (分子量:536.08)

Table.3-3-10 ゲルの作製条件

	FBN-432	FBN-444	ElaA+ FBN-432	Ela+ FBN-444	ElaE+ FBN-432	ElaE+ FBN-444
ElastinA(mg)	0	0	24	24	0	0
ElastinE(mg)	0	0	0	0	24	24
RBITC Fibrillin-X (mg)	48 (FBN- 432)	48 (FBN- 444)	24 (FBN- 432)	24 (FBN- 444)	24 (FBN- 432)	24 (FBN- 444)
Dode-DSP(μ l) (363.7mM)	17.75	17.75	17.75	17.75	17.75	17.75
Milli-Q(μ l)	42.73	42.73	42.73	42.73	42.73	42.73
Na ₂ CO ₃ aq(μ l) (500mM)	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52

Table.3-3-11 ゲルの撮影条件

	FITC	FITC(406-)	Rhodamine
レーザー	Argon 488	Diode 405	DPSS 561-10
蛍光波長(nm)	493-634	406-634	566-685
フィルター	MBS488	MBS488	MBS458/561

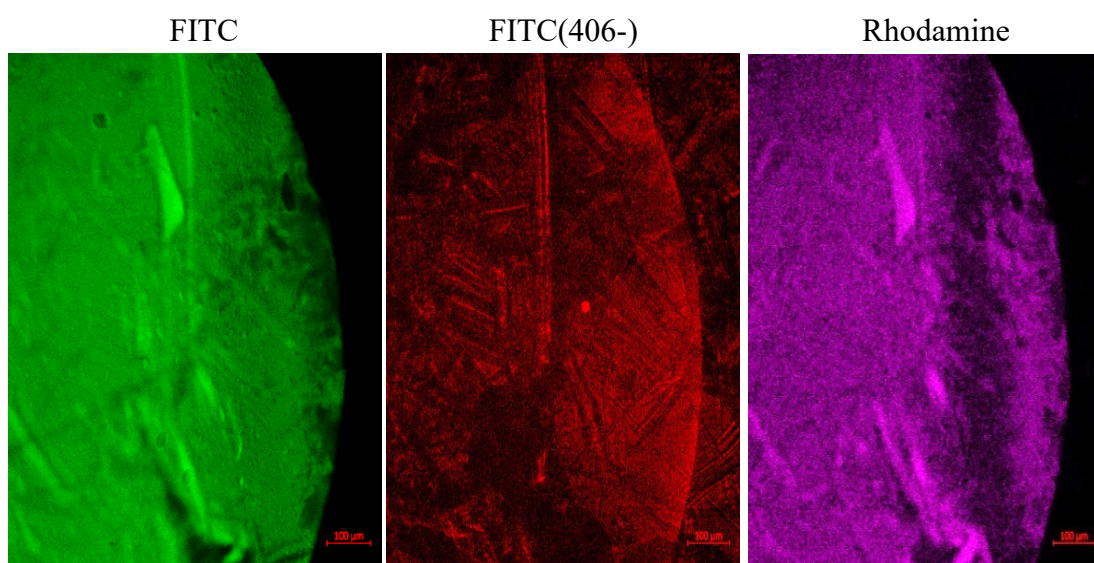


Fig.3-3-66 FBN-432 Gel の異なる撮影条件での観察

Rhodamine で蛍光観察することができたため、ラベル化に成功した。(Fig.3-3-66)

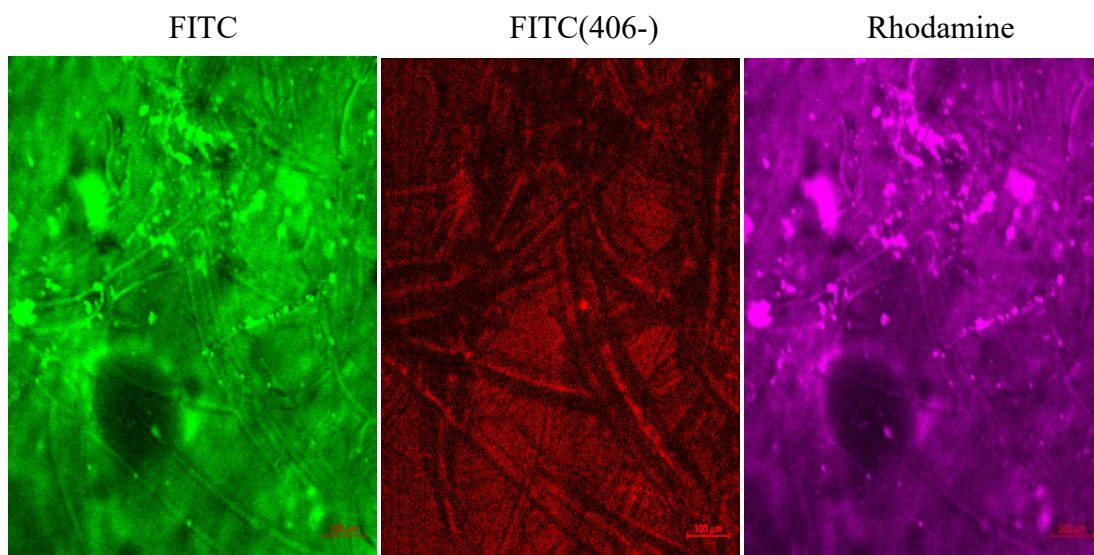


Fig.3-3-67 FBN-444 Gel の異なる撮影条件での観察

Rhodamine で蛍光観察することができたため、ラベル化に成功した。(Fig.3-3-67)

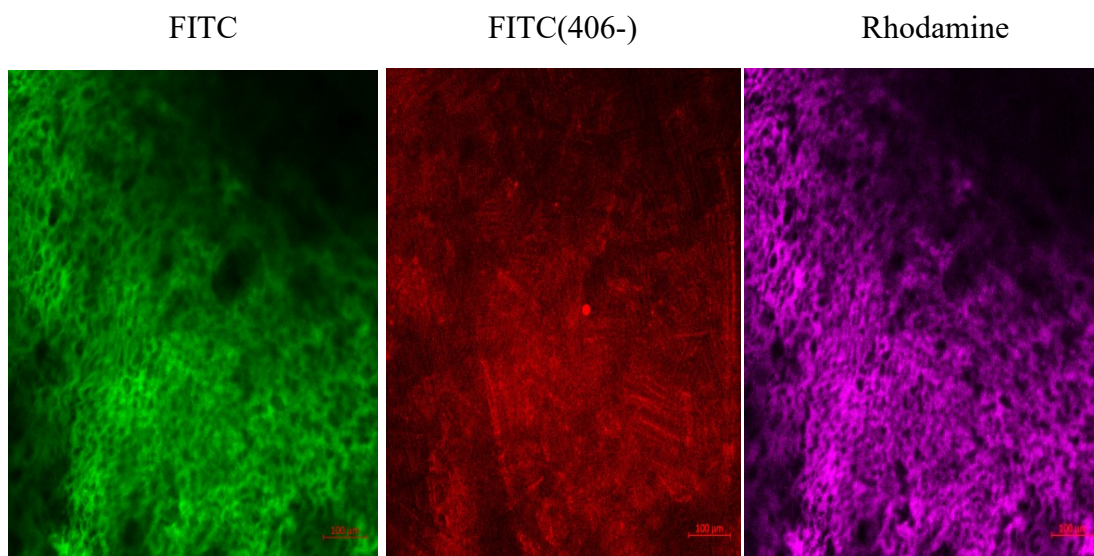


Fig.3-3-68 ElastinA+FBN-432 Gel の異なる撮影条件での観察

Rhodamine で蛍光観察することができたため、ラベル化に成功した。(Fig.3-3-68)

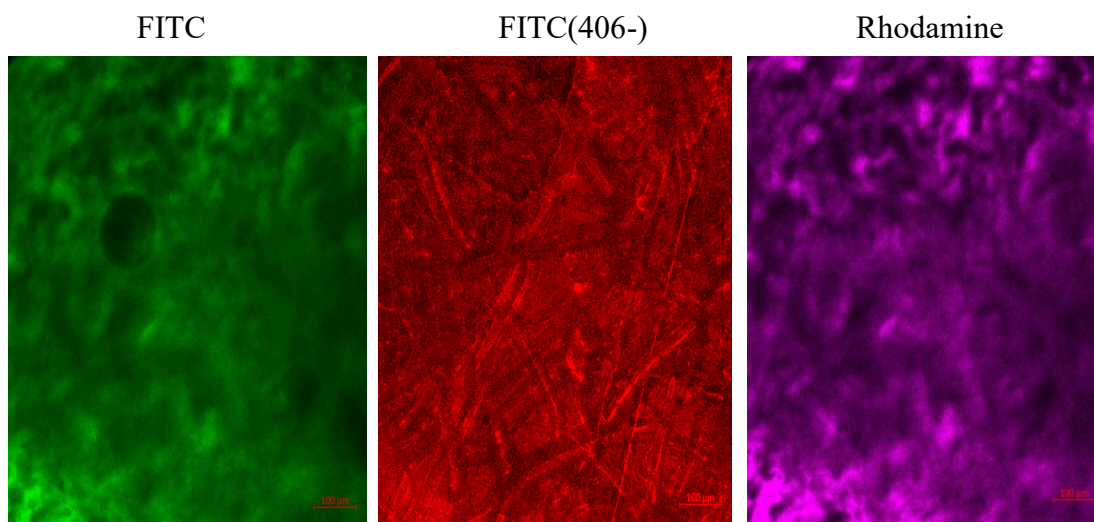


Fig.3-3-69 ElastinA+FBN-444 Gel の異なる撮影条件での観察

Rhodamine で蛍光観察することができたため、ラベル化に成功した。(Fig.3-3-70)

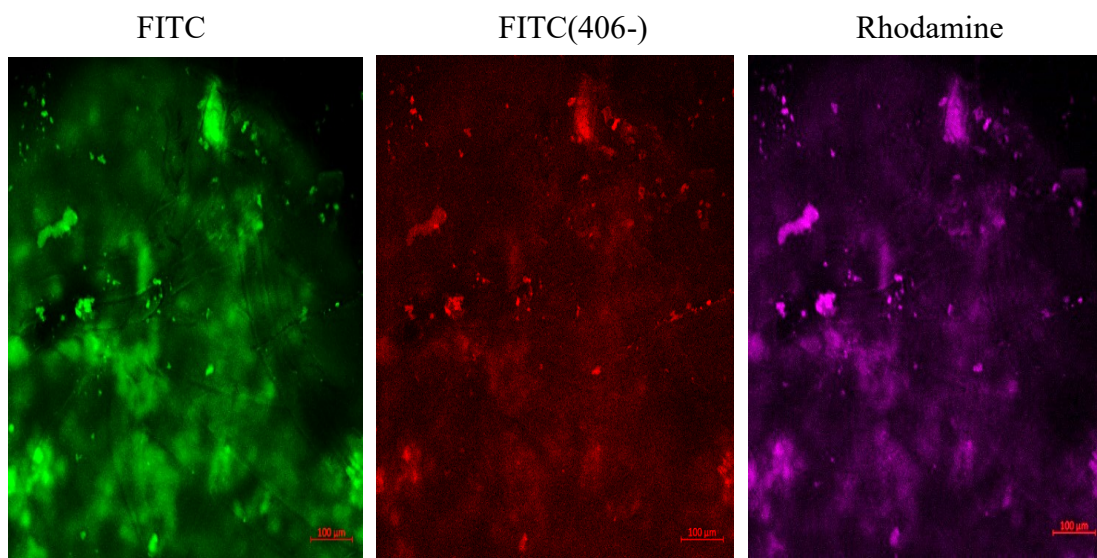


Fig.3-3-70 ElastinE+FBN-432 Gel の異なる撮影条件での観察

Rhodamine で蛍光観察することができたため、ラベル化に成功した。(Fig.3-3-70)

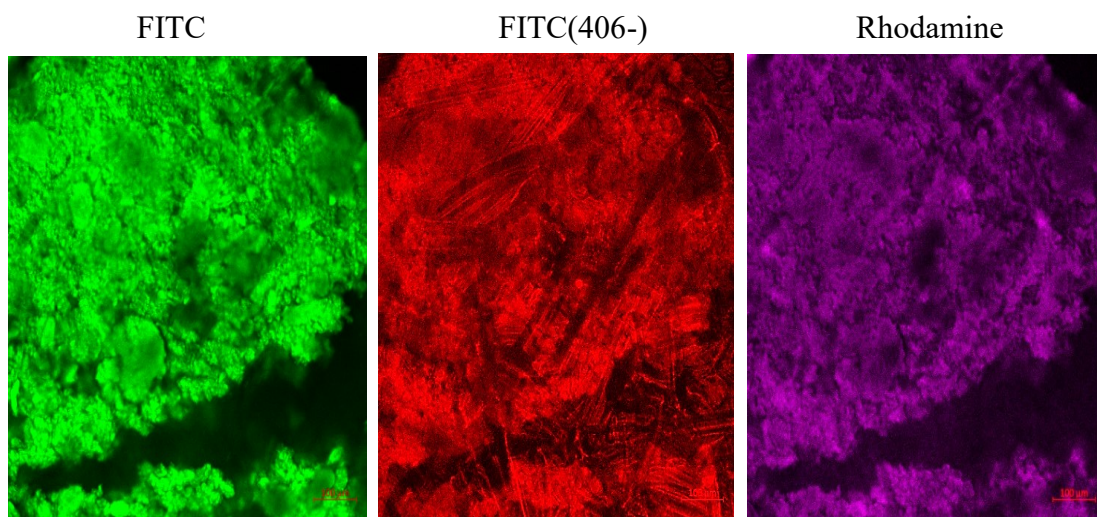


Fig.3-3-71 ElastinE+FBN-444 Gel の異なる撮影条件での観察

Rhodamine で蛍光観察することができたため、ラベル化に成功した。(Fig.3-3-71)

3-3-16 水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画のまとめ

3-3-1 から抽出した水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画として様々な特性の測定を行った結果を Table.3-3-12 に示した。

Table.3-3-12 水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画における測定結果のまとめ

サンプル No	純度 (%)	弾性率 (kPa)	伸長率 (%)	膨潤度 (D/Do) ³	凝集温度 (°C)	接触角 (°)
FBN-411	91	79	121	1.88	70 以上	51.96
FBN-412	92	200	88	1.00	70 以上	47.93
FBN-413	88	284	80	1.22	70 以上	46.70
FBN-414	85	346	81	1.00	70 以上	45.11
FBN-415	78	288	64	1.00	70 以上	42.89
FBN-416	69	334	84	0.86	62.8	39.22
FBN-417	65	171	121	1.15	60.0	40.81
FBN-418	57	103	60	1.48	46.5	39.78
FBN-419	39	96	177	1.00	41.4	43.07
FBN-4110	15	61	94	2.15	39.2	43.07
FBN-4111	0	51	63	1.81	39.9	42.74
FBN-4112	3	66	76	1.52	55.7	41.93

抽出した水溶性 Fibrillin に対してアミノ酸組成分析、弾性率・伸長率・膨潤度・凝集温度測定を行った結果、サンプル No が大きくなるにつれて各パラメーターに傾向が見られることが分かった。その中でも顕著に変化が見られたのは弾性率と凝集温度であった。この測定の結果より、高温架橋 Fibrillin Gel を 1 日脱イオン水に浸した後の弾性率と凝集温度の両方の値が Table.3-3-13 のようになる水溶性 Fibrillin をそれぞれ、「Fibrillin-X」、「Fibrillin-Y」、「Fibrillin-Z」という 3 種類のクラスに分画することを定義した。

Table.3-3-13 弾性率と凝集温度による水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画

クラス	X	Y	Z
弾性率 (kPa)	200 以上	200-100	100 以下
凝集温度 (°C)	70 以上	70-45	45 以下

本研究で抽出した水溶性 Fibrillin をこの定義に従って、アイソタイプ分画し、Table.3-3-14 に示した。

Table.3-3-14 抽出した水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画

サンプル No	弾性率 (kPa)	凝集温度 (°C)	クラス
FBN-411	78	70 以上	(Fibrillin-XX)
FBN-412	200	70 以上	Fibrillin-X
FBN-413	283	70 以上	Fibrillin-X
FBN-414	346	70 以上	Fibrillin-X
FBN-415	288	70 以上	Fibrillin-X
FBN-416	334	62.8	(Fibrillin-YY)
FBN-417	171	60.0	Fibrillin-Y
FBN-418	103	46.5	Fibrillin-Y
FBN-419	96	41.4	Fibrillin-Z
FBN-4110	61	39.2	Fibrillin-Z
FBN-4111	51	39.9	Fibrillin-Z
FBN-4112	66	55.7	(Fibrillin-ZZ)

FBN-412,413,414,415 は「Fibrillin-X」、FBN-417,418 は「Fibrillin-Y」、FBN-419,4110,4111 は「Fibrillin-Z」となった。FBN-411,416,4112 は定義した分画基準には合わないサンプルであった。(Table.3-3-14)

本研究では高強度の Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の開発を目指しているため、この 3 種類の中で最も弾性率の高い「Fibrillin-X」を以後の実験に用いた。

3-4 低温架橋 Elastin Gel の作製(A Gel)

異なる加速剤濃度の低温架橋 Elastin Gel を作製し、力学的強度測定及びゲル化時間測定を行った。力学的強度測定はゲルを作製し、取り出した直後のゲルで行った。ゲルの作製条件は Table.3-4-1 に示した。

Table.3-4-1 異なる加速剤濃度の低温架橋 Elastin Gel の作製条件

加速剤濃度 (mM)	0	10	20	30	40	50	60	70
ElastinA (mg)	48	48	48	48	48	48	48	48
Milli-Q (μl)	53.19	51.75	50.31	48.87	47.43	45.99	44.55	43.11
Dode-DSP (343.2mM) (μl)	18.81	18.81	18.81	18.81	18.81	18.81	18.81	18.81
Na ₂ CO ₃ aq (μl)	0	1.44	2.88	4.32	5.76	7.20	8.64	10.08
	80	90	100	110	120	130	140	150
	48	48	48	48	48	48	48	48
	41.67	40.23	38.79	37.35	35.91	34.47	33.03	31.59
	18.81	18.81	18.81	18.81	18.81	18.81	18.81	18.81
	11.52	12.96	14.40	15.84	17.28	18.72	20.16	21.60

3-4-1 力学的強度測定

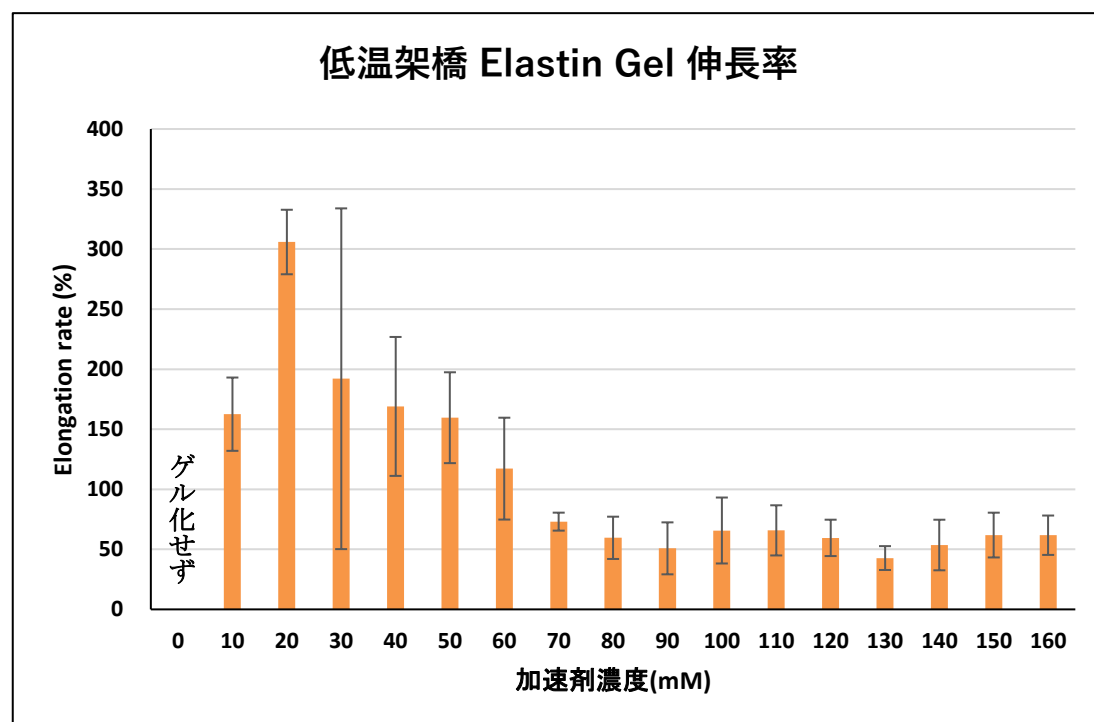
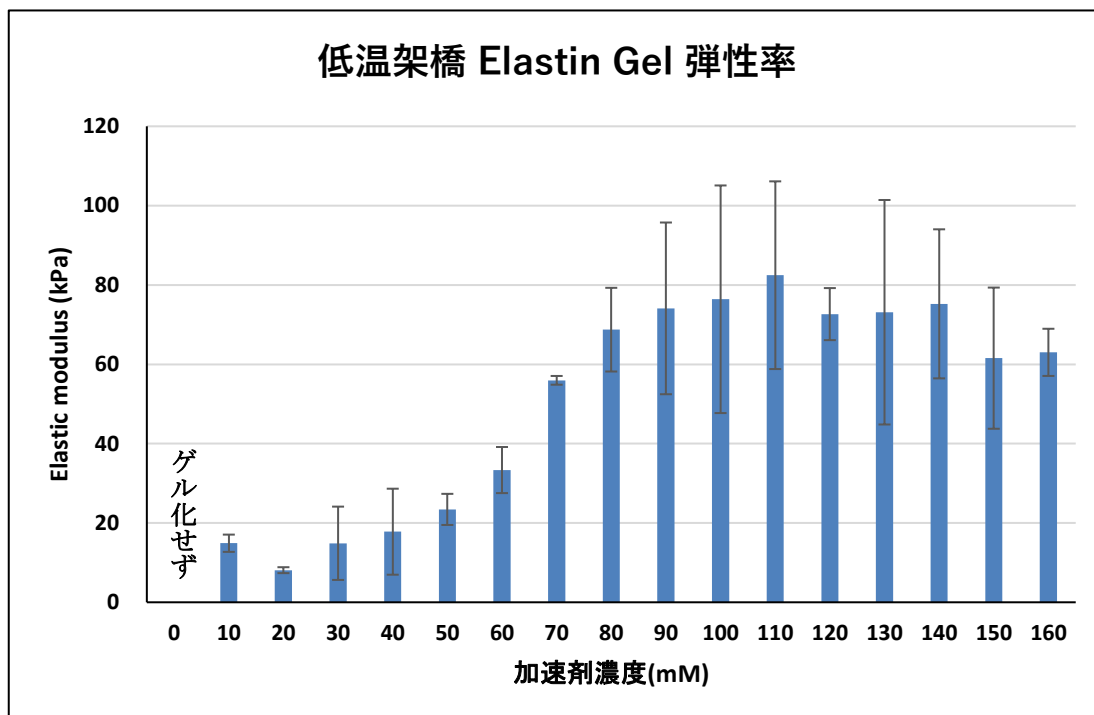


Fig.3-4-1 加速剤濃度別 Elastin Gel の弾性率・伸長率

加速剤濃度を高くしていくと弾性率は高くなり、伸長率は低くなる傾向であった。
(Fig.3-4-1)

3-4-2 ゲル化時間測定

加速剤濃度を高くしていくと弾性率は高くなり、伸長率は低くなるということが分かった。しかし、加速剤濃度を高くすると pH が塩基側に偏るため細胞毒性が強くなる。以前の研究より加速剤濃度 80mM 以下なら細胞毒性が少ないということがわかっている。そこで実験条件を 30mM～80mM の間に設定しゲル化時間測定を行った。

加速剤濃度	30mM	40mM	50mM	60mM	70mM	80mM
ElastinA ①(min)	107.72	94.52	42.59	30.43	21.11	22.78
ElastinA ②(min)	123.68	90.23	33.19	38.00	18.00	18.00
ElastinA ③(min)	93.12	63.16	26.51	30.97	17.14	10.00

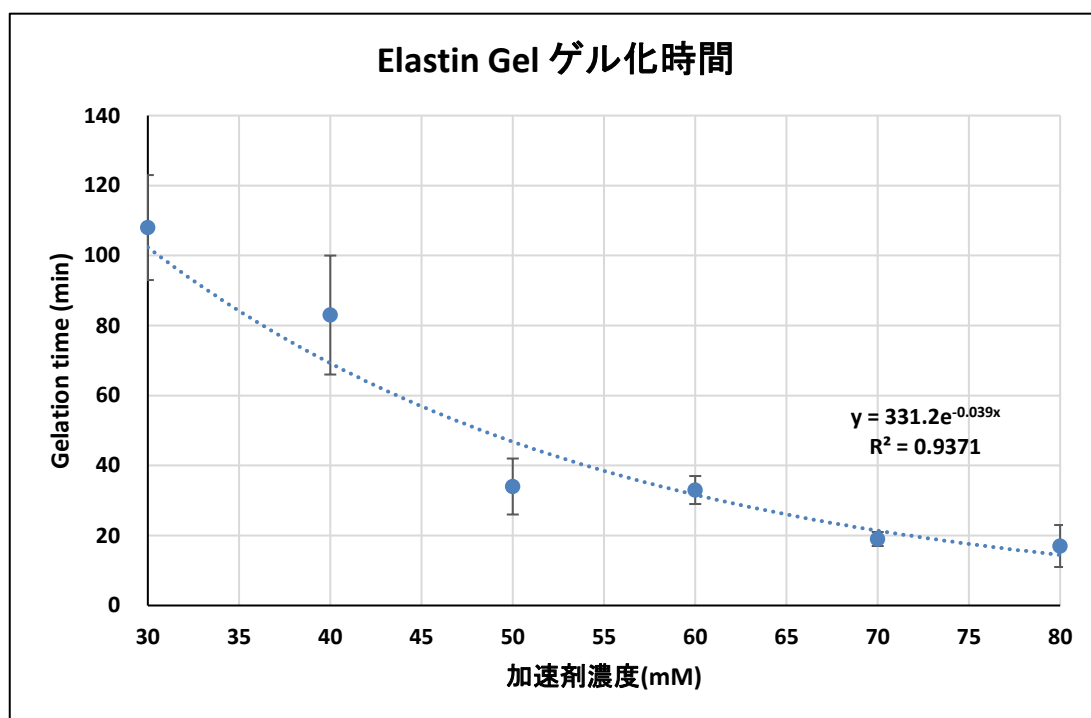


Fig.3-4-2 加速剤濃度別 Elastin Gel のゲル化時間

加速剤濃度を高くすると Elastin Gel のゲル化時間は短くなるということが分かった。(Fig.3-4-2) 加速剤濃度 80mM の Elastin Gel が最もゲル化時間が短かったためこの加速剤濃度で実験を進めた。

3-5 貫通孔を持つ Elastin Gel の作製 (ElastinA+ElastinE Gel:AE Gel)

細胞を 3 次元培養することを可能にするために貫通孔を持つ低温架橋 Elastin Gel を作製し、力学的強度測定、膨潤度測定及び構造観察を行った。ゲルの作製条件は Table.3-5-1 に示した。

Table.3-5-1 貫通孔を持つ低温架橋 Elastin Gel (AE Gel) の作製条件と観察条件

ElaA:ElaE	100:0	90:10	80:20	70:30	60:40	50:50	40:60	30:70	20:80	10:90
ElastinA (mg)	48	43.2	38.4	33.6	28.8	24	19.2	14.4	9.6	4.8
ElastinE (mg)	0	4.8	9.6	14.4	19.2	24	28.8	33.6	38.4	43.2
Milli-Q (μ l)	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Dode-DSP (315.3mM) (μ l)	20.48	20.48	20.48	20.48	20.48	20.48	20.48	20.48	20.48	20.48
Na ₂ CO ₃ aq (500mM) (μ l)	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52
Slices (μ m)	500	400	300	290	300	300	500	500	500	500
Range (μ m)	300.5	374.9	159.0	115.6	119.4	123.5	204.8	264.0	376.0	265.0
Interval (枚)	0.60	0.94	0.53	0.40	0.40	0.41	0.41	0.53	0.75	0.89

共焦点レーザー顕微鏡での撮影時には抗体や蛍光色素は用いず、Elastin の自家蛍光を利用し撮影した Argon488 のレーザー (励起波長 488nm) を使用した。

3-5-1 力学的強度測定

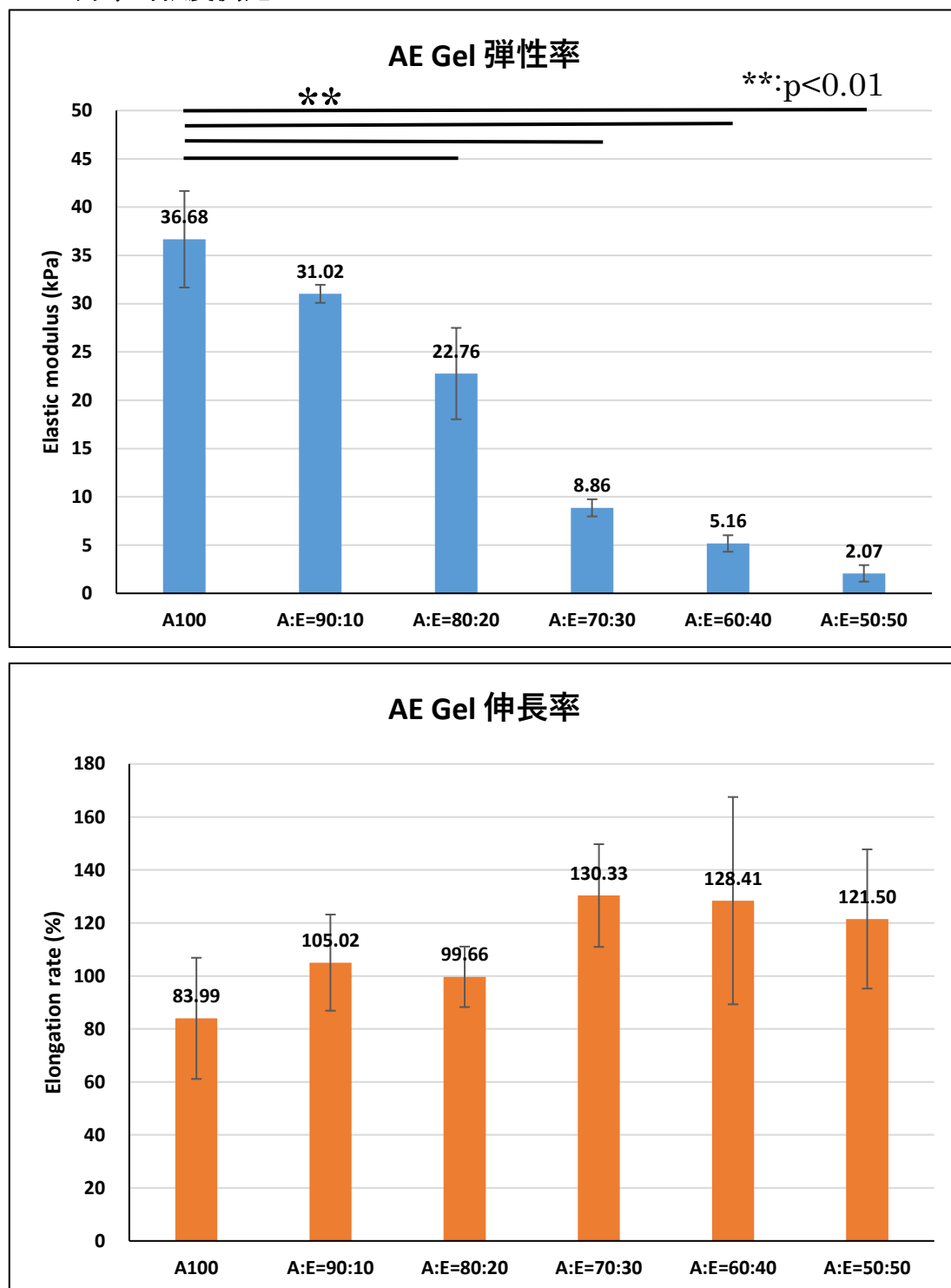


Fig.3-5-31 貫通孔を持つ低温架橋 Elastin Gel (AE Gel) 弾性率・伸長率

ElastinE の割合が高くなるにつれて、弾性率は有意に減少し、伸長率は上昇する傾向であった。(Fig.3-5-1)

3-5-2 膨潤度測定

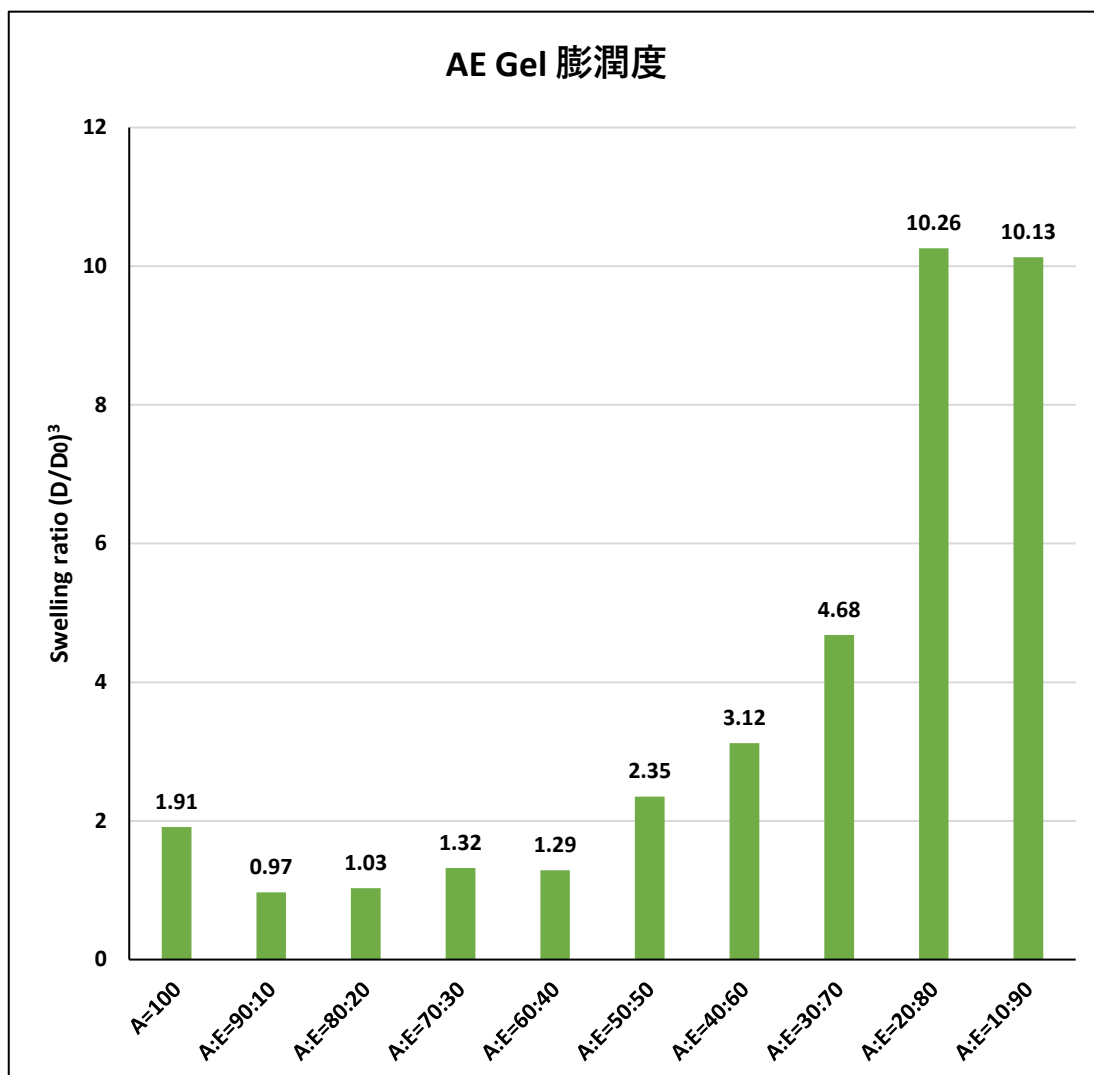


Fig.3-5-2 貫通孔を持つ低温架橋 Elastin Gel (AE Gel) の膨潤度

ElastinE の割合が高くなるにつれて、膨潤度は上昇する傾向であった。(Fig.3-5-2)

3-5-3 走査型電子顕微鏡 (SEM) での構造観察

ElastinA:elastinE=100:0 Gel と ElastinA:ElastinE=50:50 の Elastin Gel を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

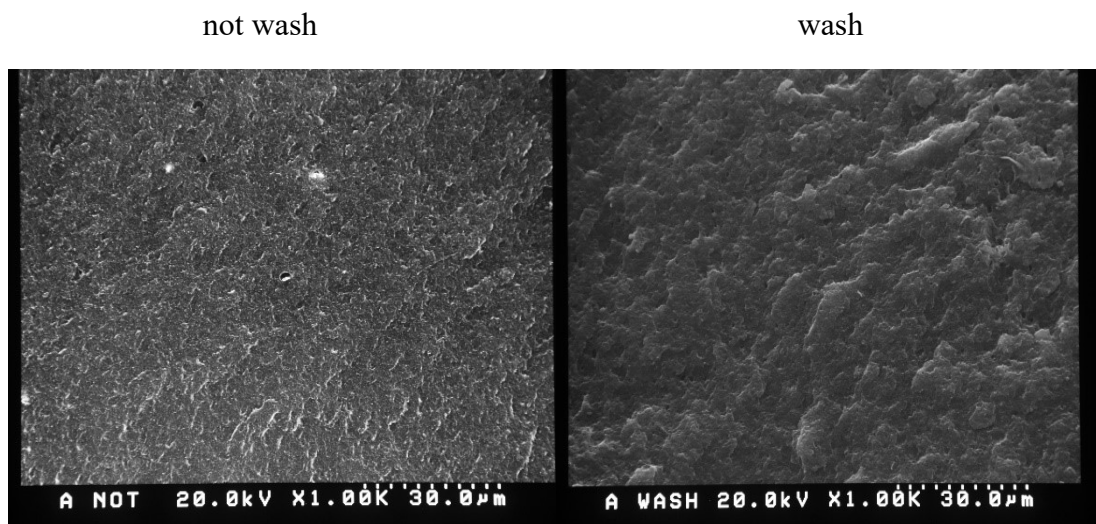


Fig.3-5-3 ElastinA:ElastinE=100:0 Gel 構造

ElastinA 100%Gel は洗浄(1day)前後で構造に変化はなく孔も存在していなかった。(Fig.3-5-3)

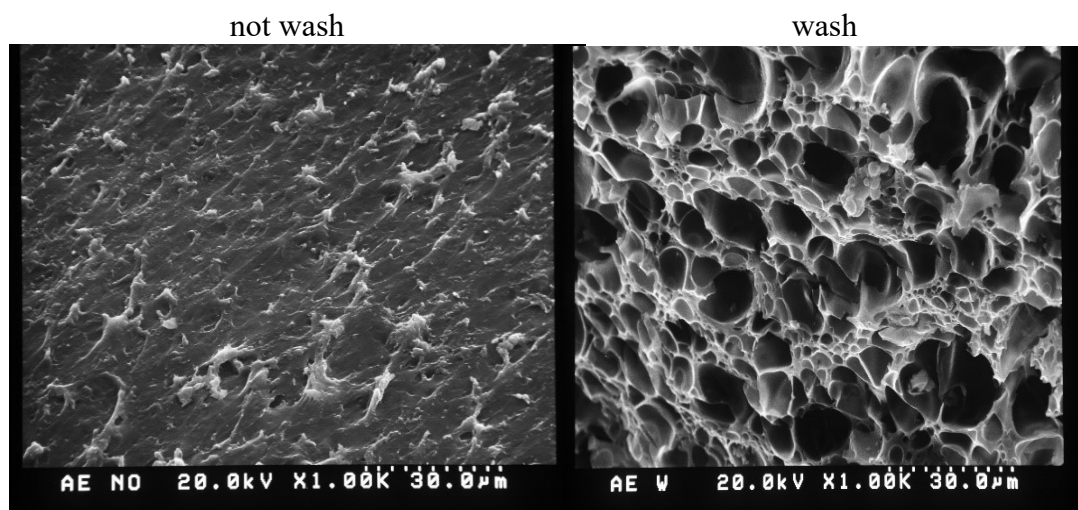


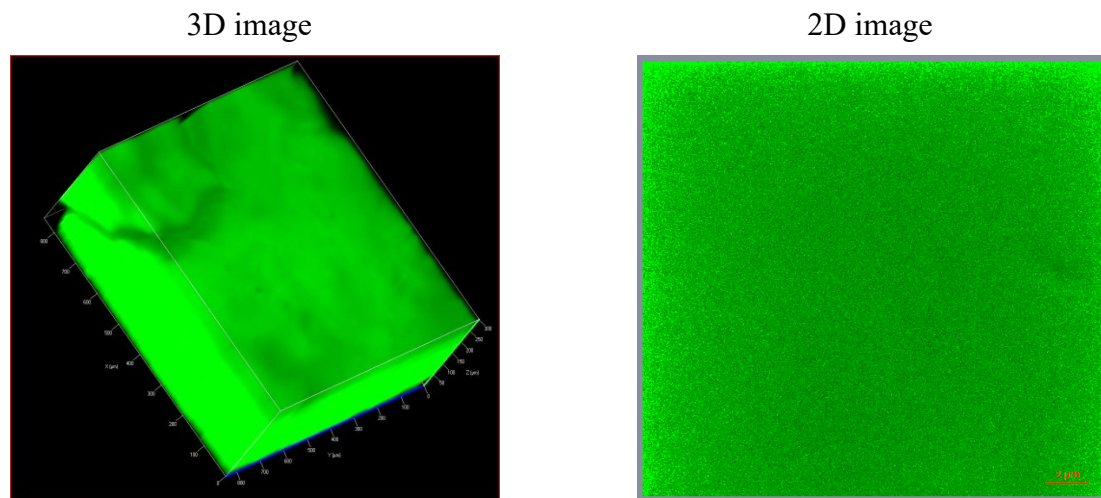
Fig.3-5-4 ElastinA:ElastinE=50:50 Gel 構造

ElastinA と ElastinE を複合させた Gel は洗浄(1day)することで孔ができた。(Fig.3-5-4)

3-5-4 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) での構造観察

ElastinA と ElastinE を混合した Gel を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察した。(Fig.3-5-5~14)

ElastinA:ElastinE=100:0



3D image 断面図

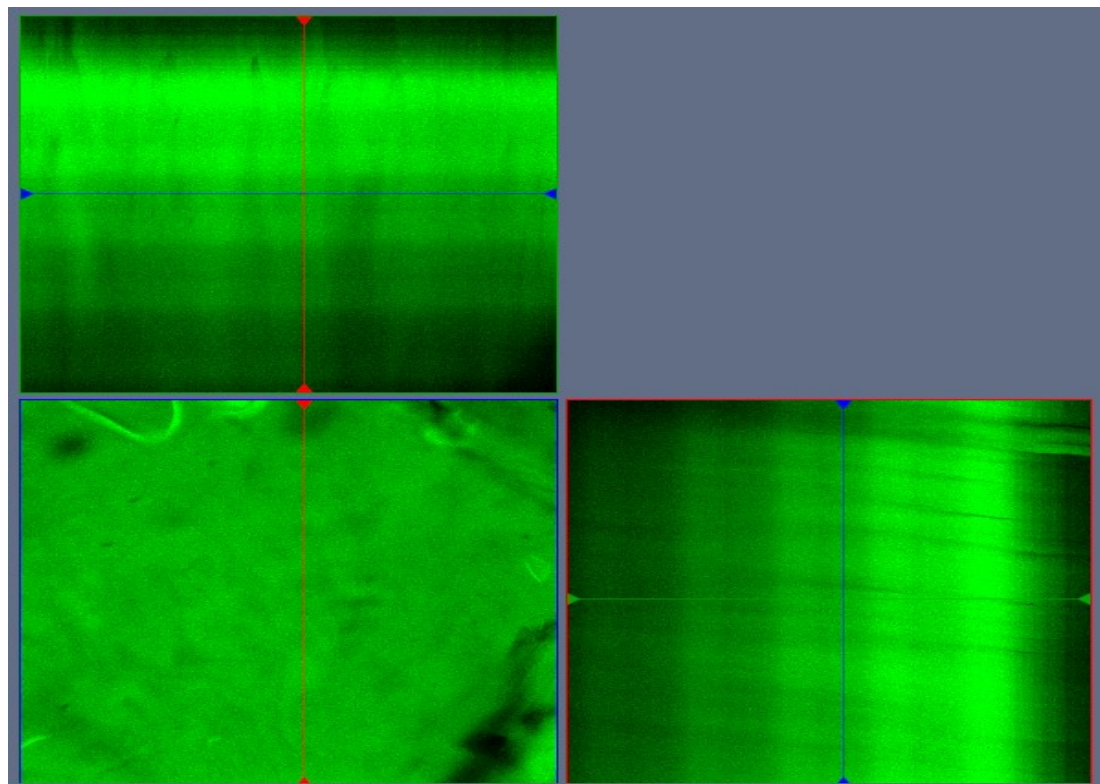
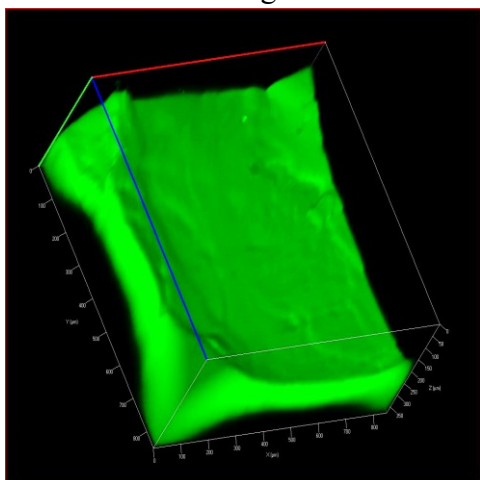


Fig.3-5-5 ElastinA:ElastinE=100:0 Gel の 2 次元・3 次元画像

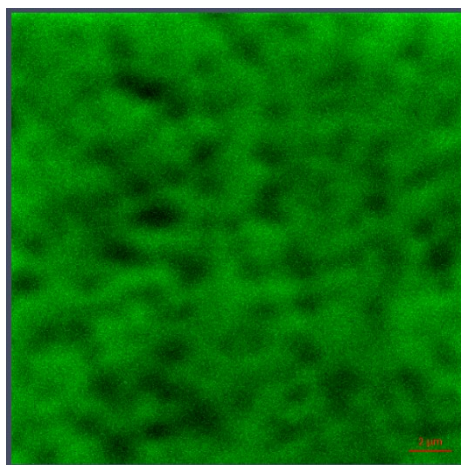
貫通孔は確認できなかった。(Fig.3-5-5)

ElastinA:ElastinE=90:10

3D image



2D image



3D image 断面図

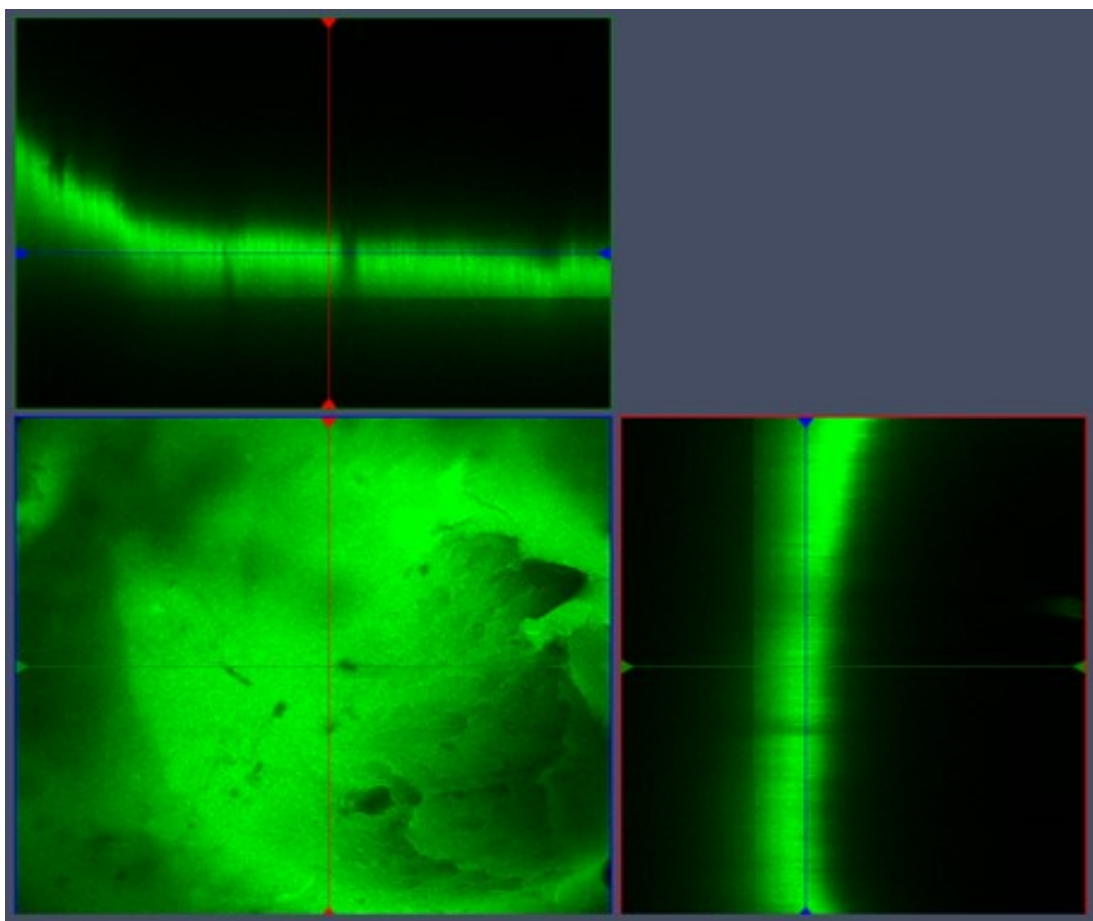
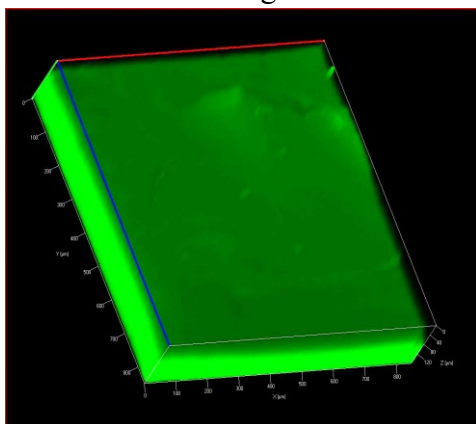


Fig.3-5-6 ElastinA:ElastinE=90:10 Gel の 2 次元・3 次元画像

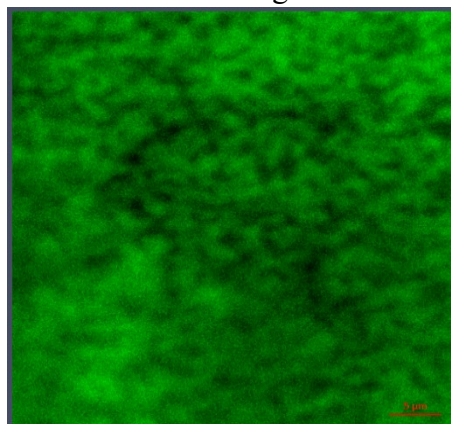
貫通孔が確認できた。(Fig.3-5-6)

ElastinA:ElastinE=80:20

3D image



2D image



3D image 断面図

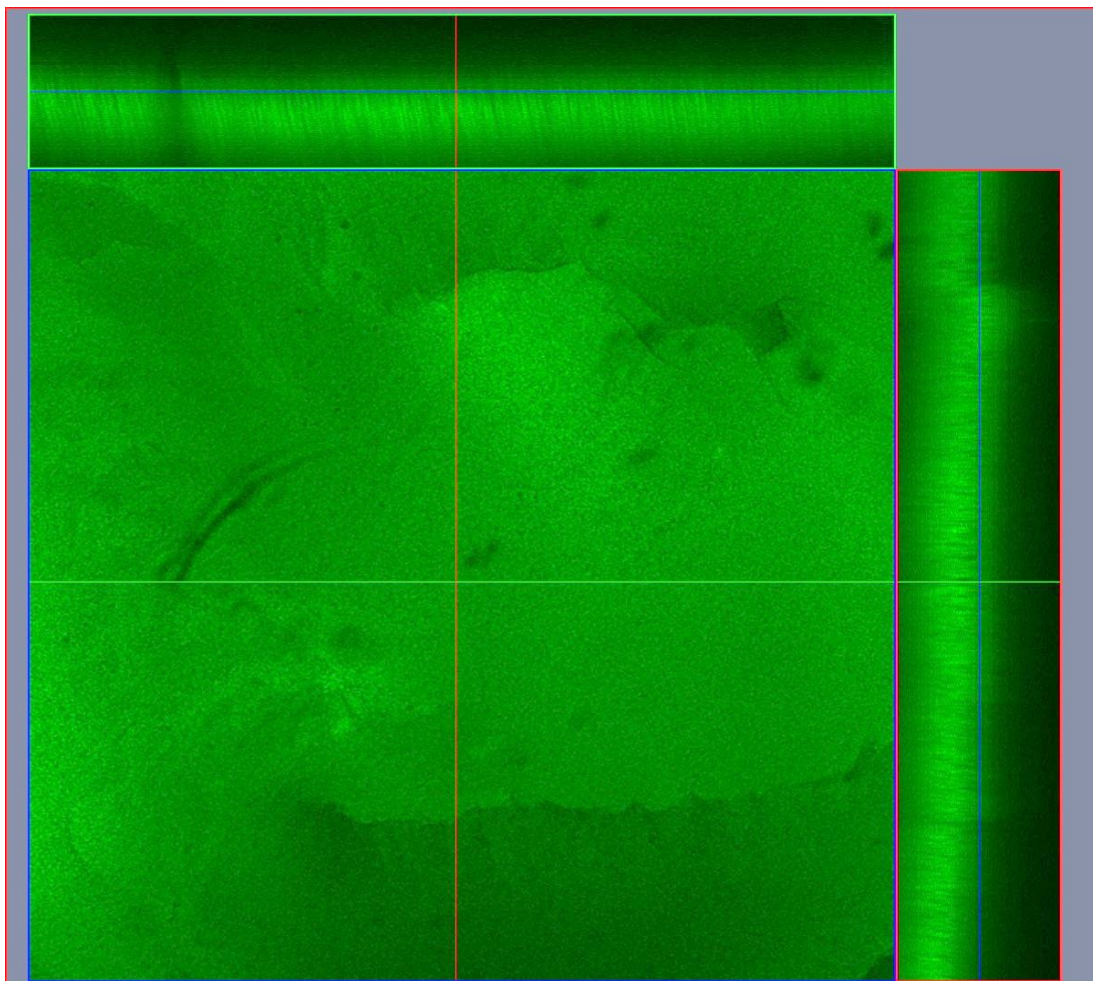
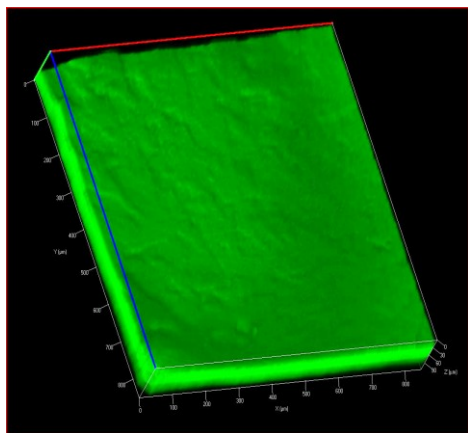


Fig.3-5-7 ElastinA:ElastinE=80:20 Gel の 2 次元・3 次元画像

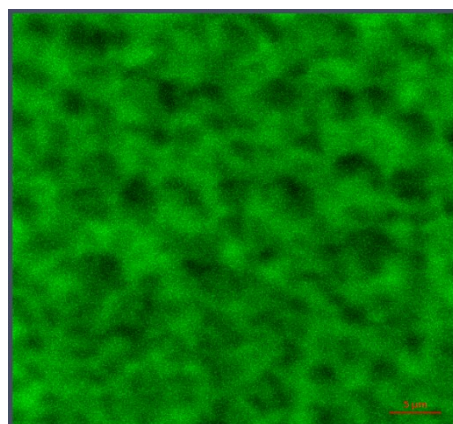
貫通孔が確認できた。(Fig.3-5-7)

ElastinA:ElastinE=70:30

3D image



2D image



3D image 断面図

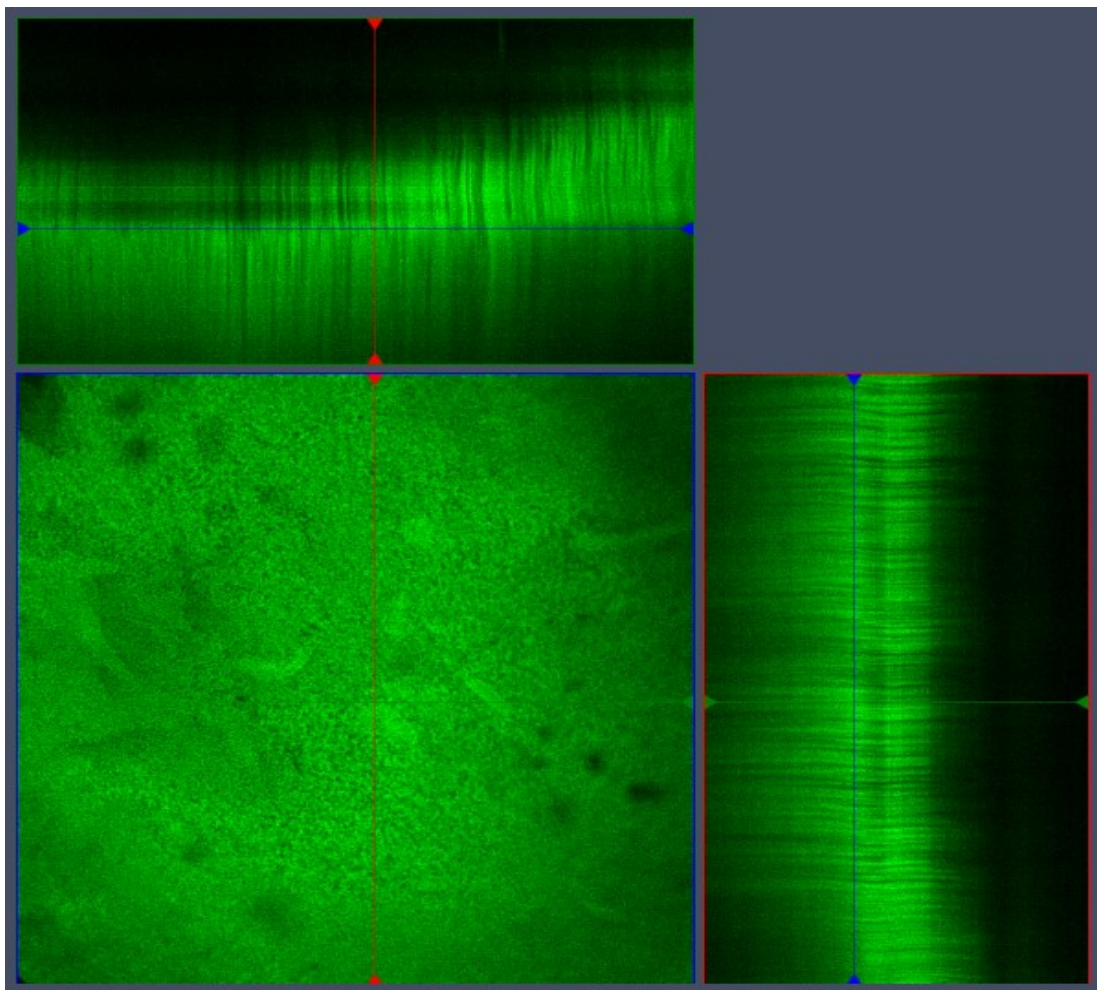
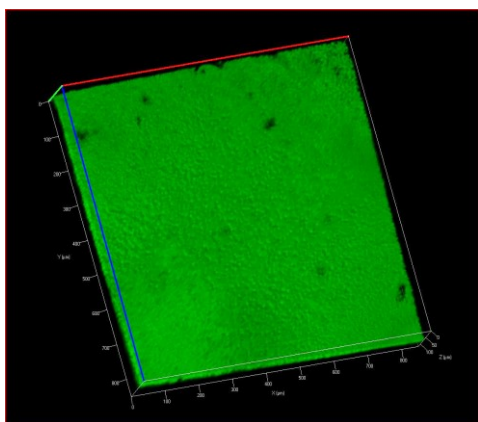


Fig.3-5-8 ElastinA:ElastinE=70:30 Gel の 2 次元・3 次元画像

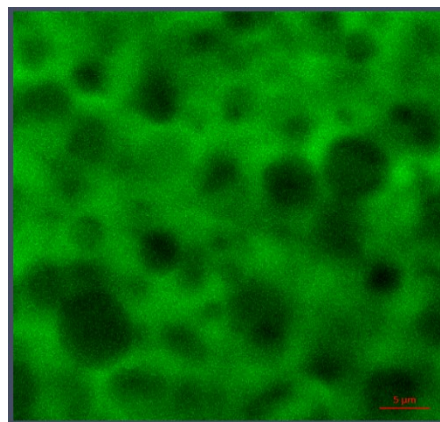
貫通孔が確認できた。(Fig.3-5-8)

ElastinA:ElastinE=60:40

3D image



2D image



3D image 断面図

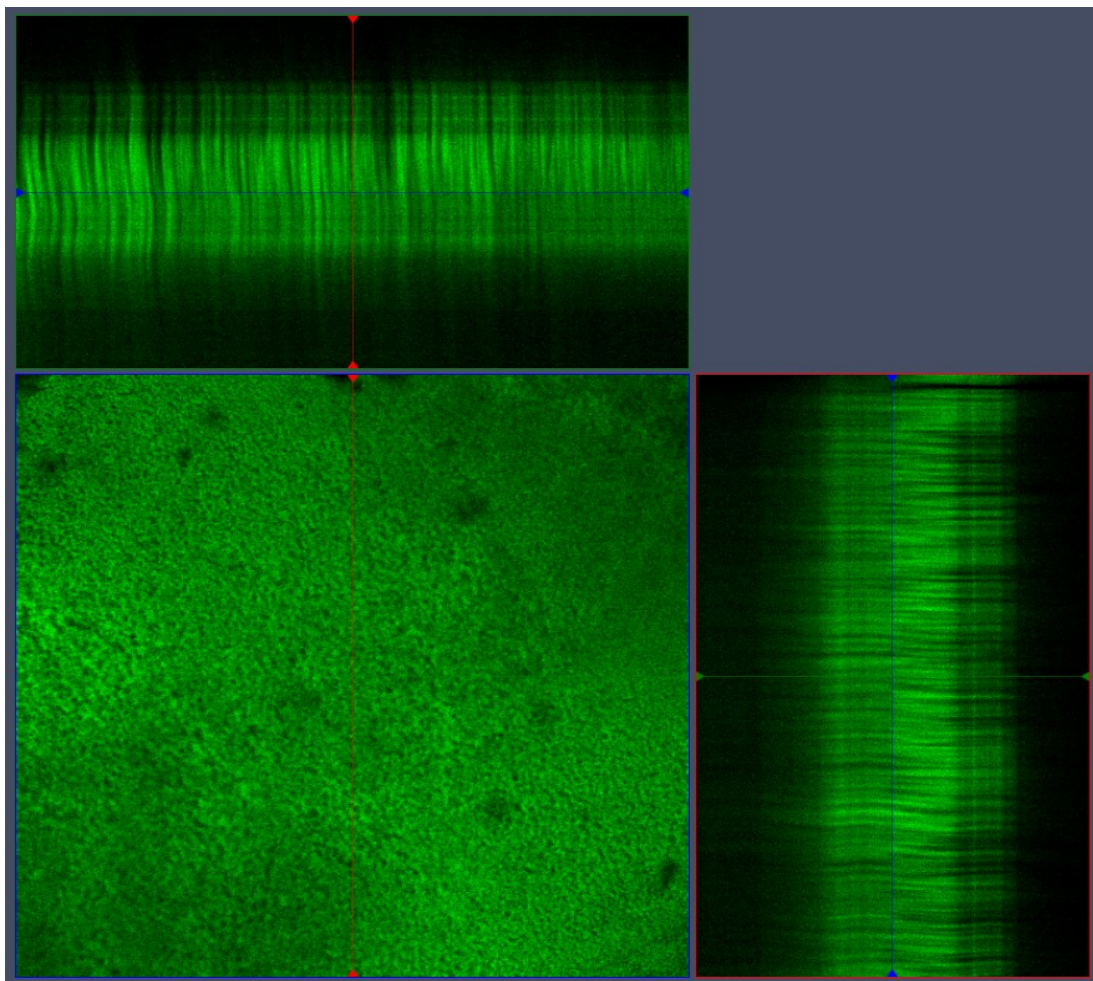
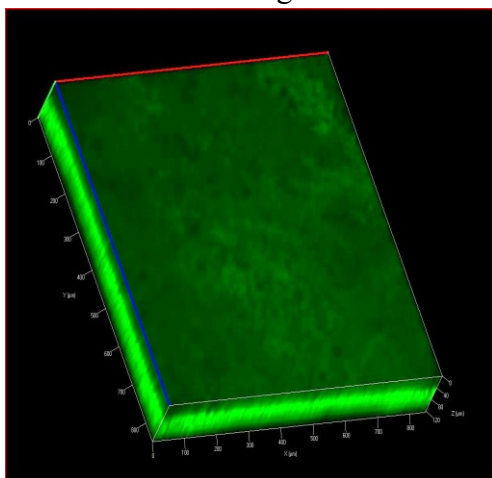


Fig.3-5-9 ElastinA:ElastinE=60:40 Gel の 2 次元・3 次元画像

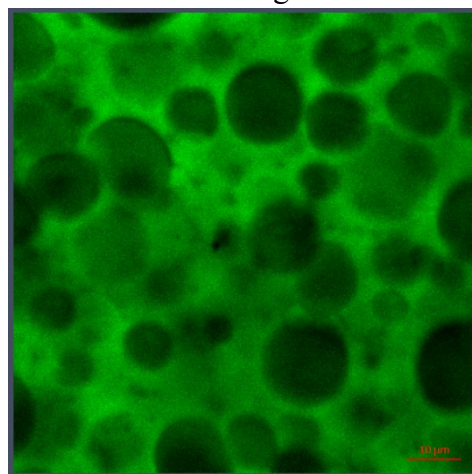
貫通孔が確認できた。(Fig.3-5-9)

ElastinA:ElastinE=50:50

3D image



2D image



3D image 断面図

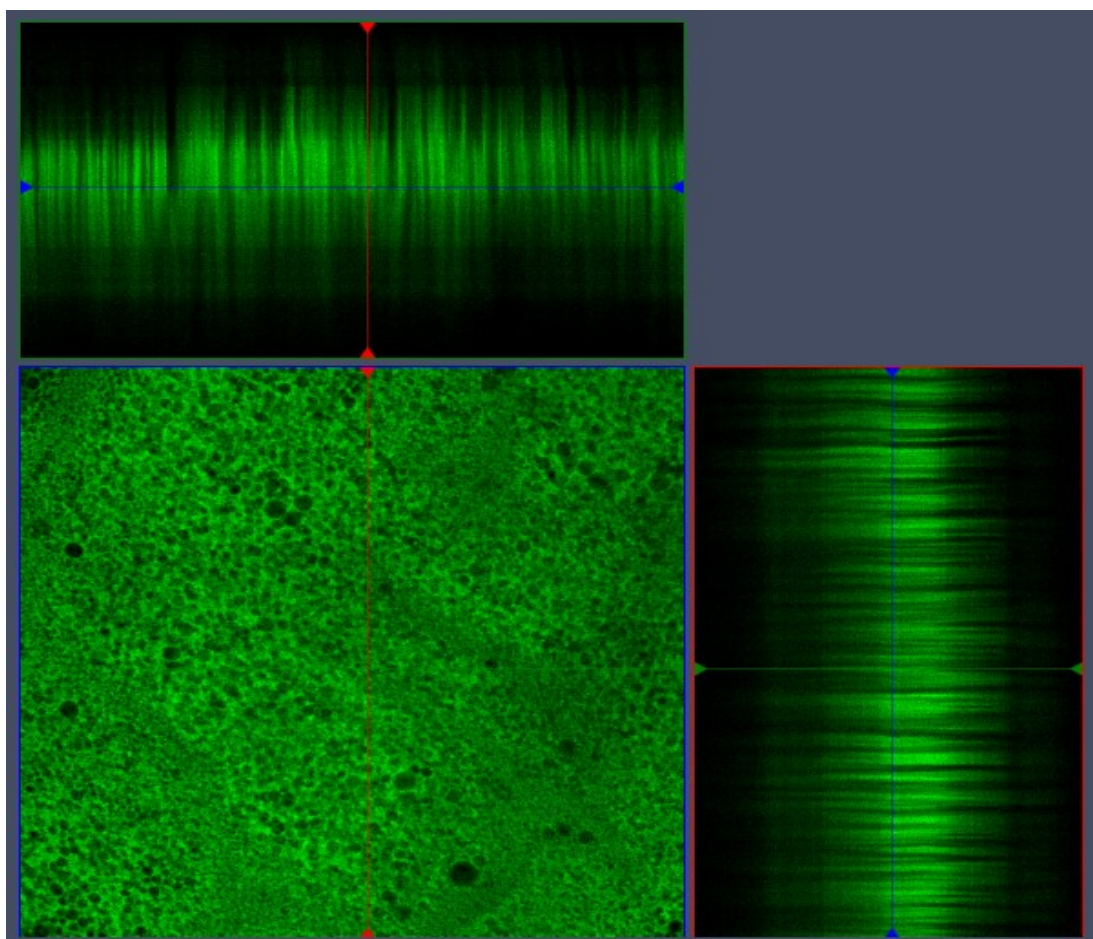
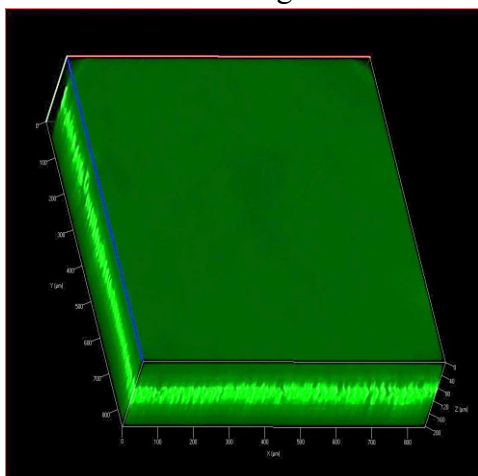


Fig.3-5-10 ElastinA:ElastinE=50:50 Gel の 2 次元・3 次元画像

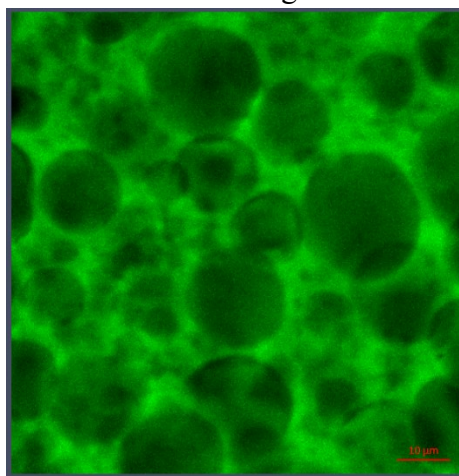
貫通孔が確認できた。(Fig.3-5-10)

ElastinA:ElastinE=40:60

3D image



2D image



3D image 断面図

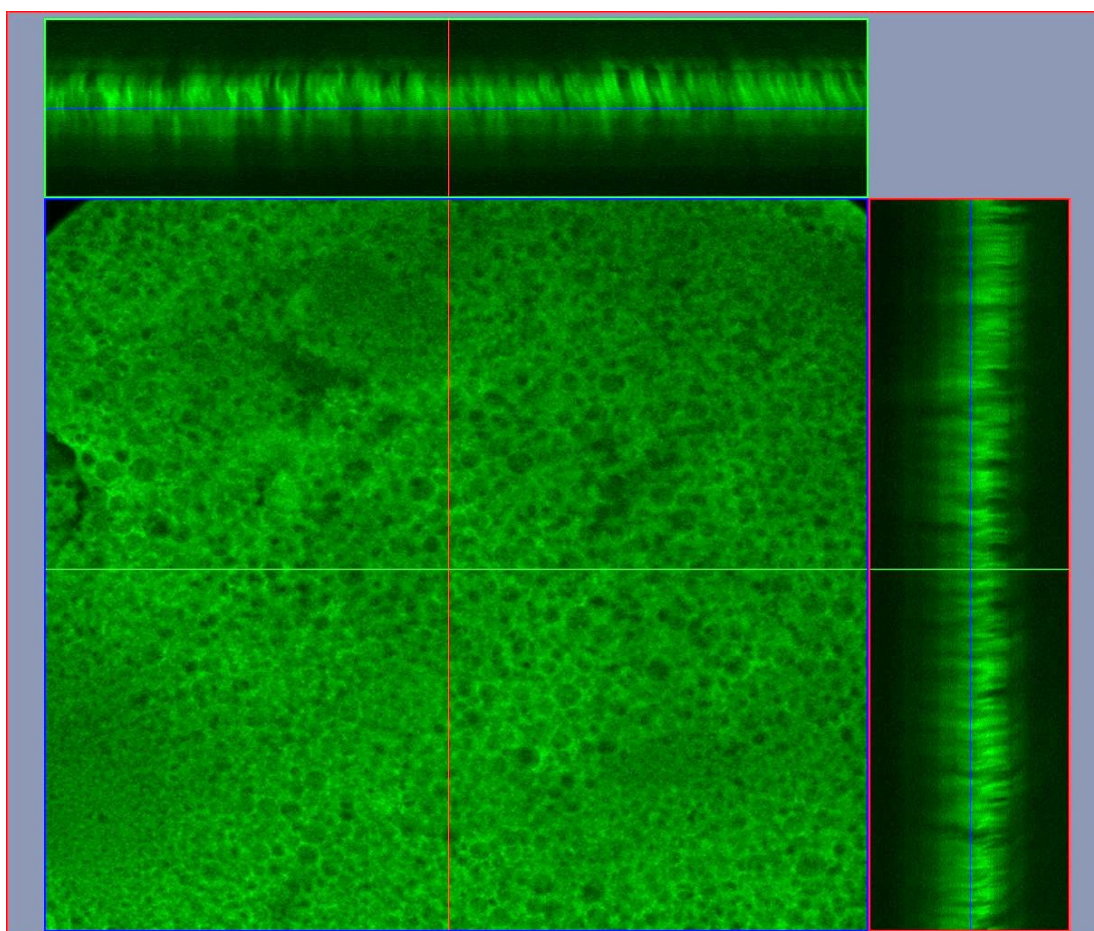
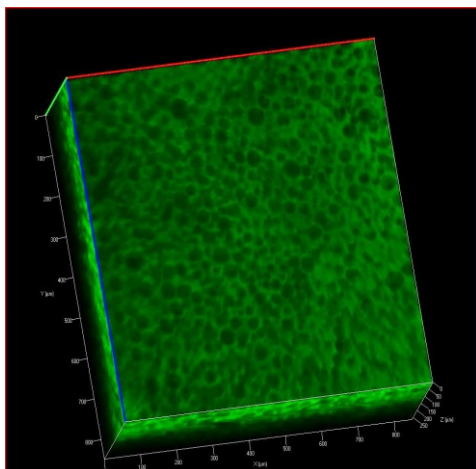


Fig.3-5-11 ElastinA:ElastinE=40:60 Gel の 2 次元・3 次元画像

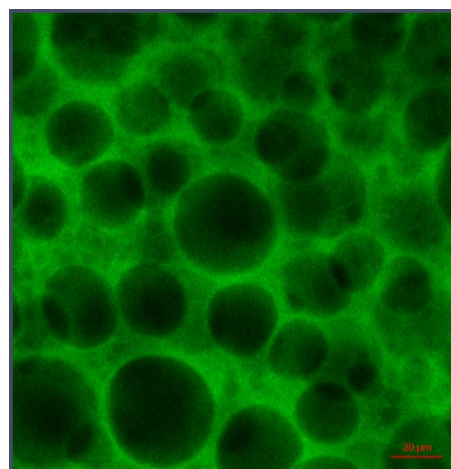
貫通孔が確認できた。(Fig.3-5-11)

ElastinA:ElastinE=30:70

3D image



2D image



3D image 断面図

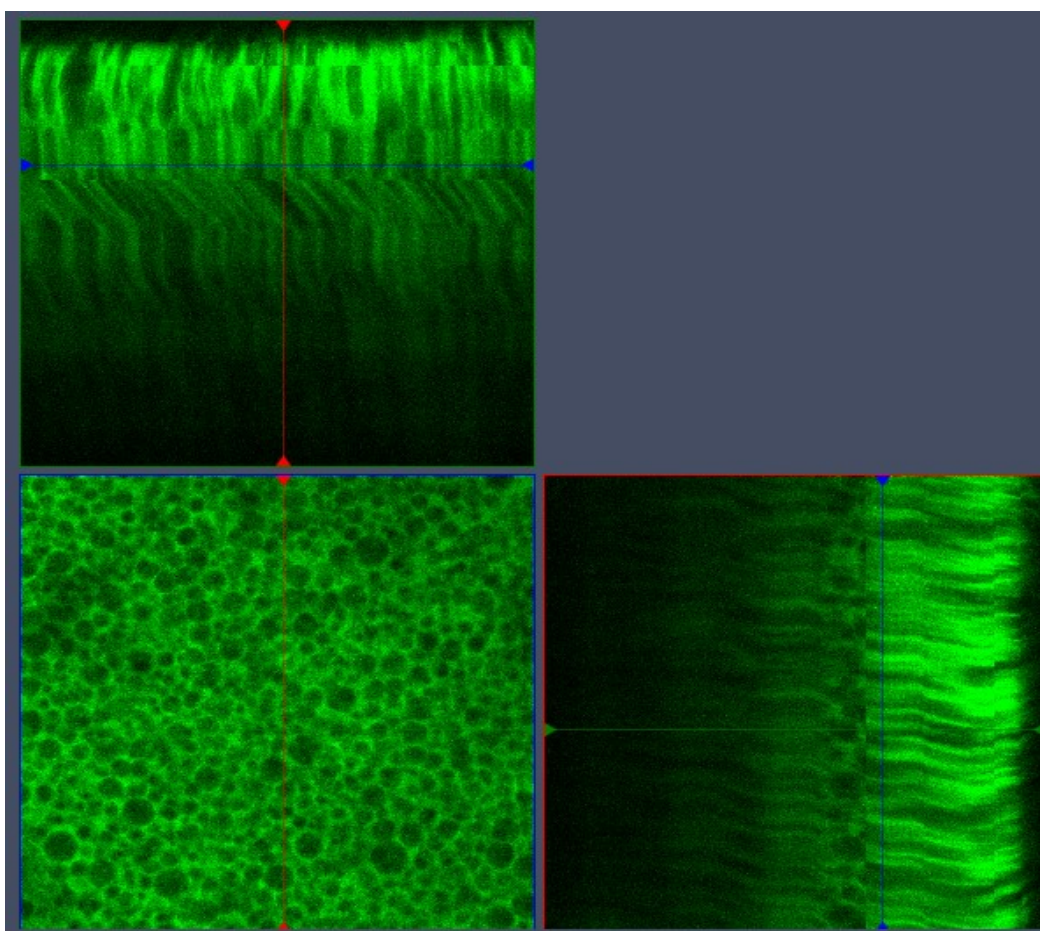
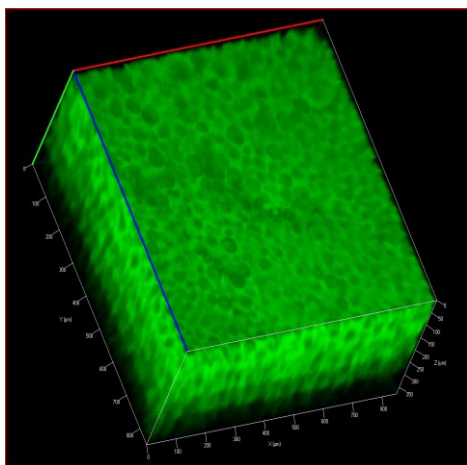


Fig.3-5-12 ElastinA:ElastinE=30:70 Gel の 2 次元・3 次元画像

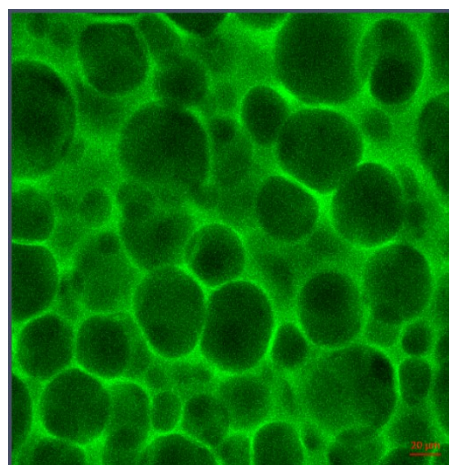
貫通孔が確認できた。(Fig.3-12)

ElastinA:ElastinE=20:80

3D image



2D image



3D image 断面図

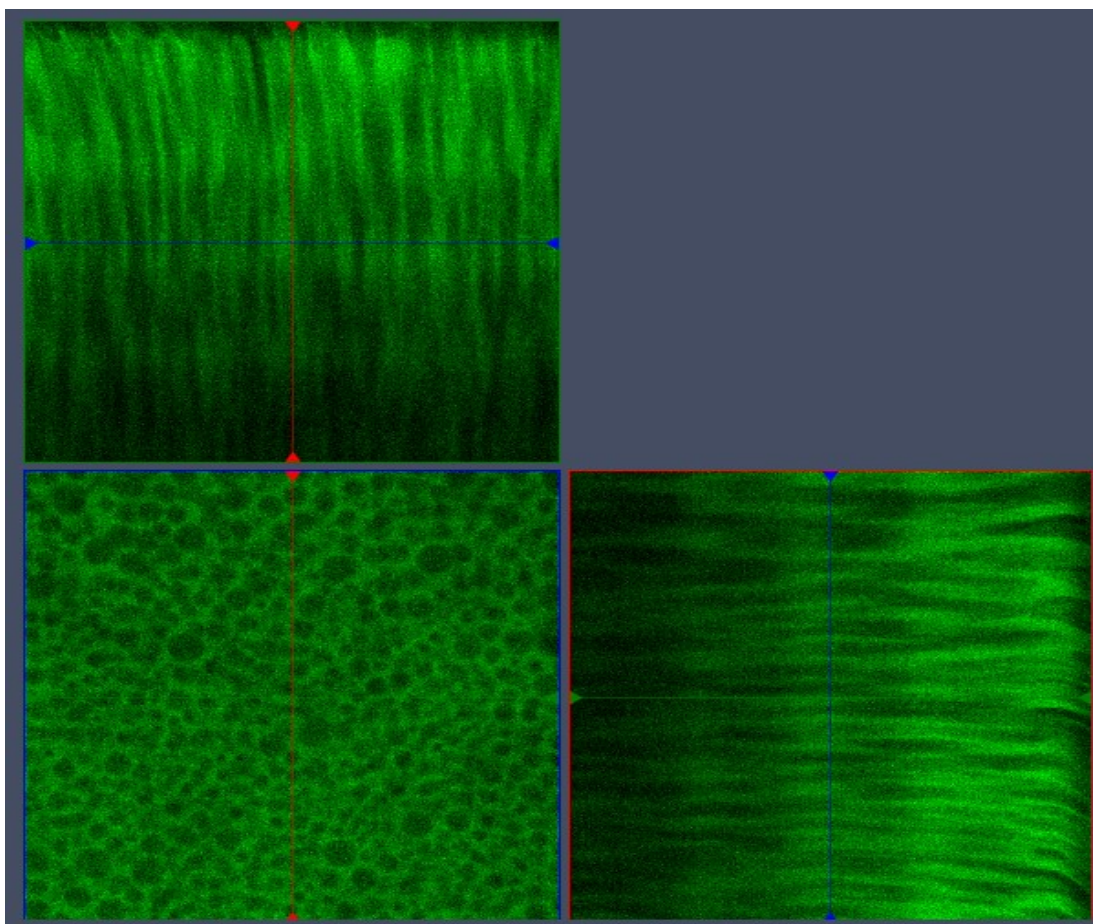
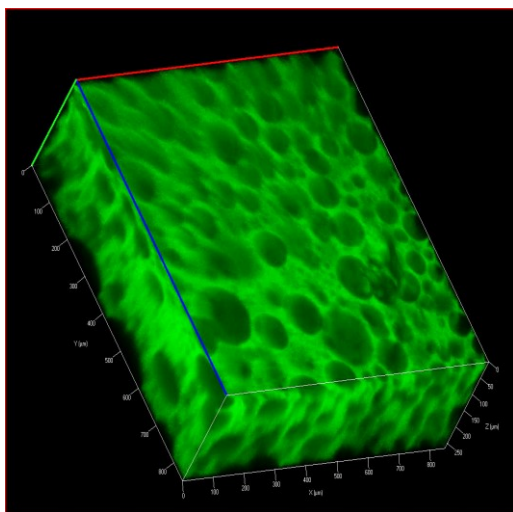


Fig.3-5-13 ElastinA:ElastinE=20:80 Gel の 2 次元・3 次元画像

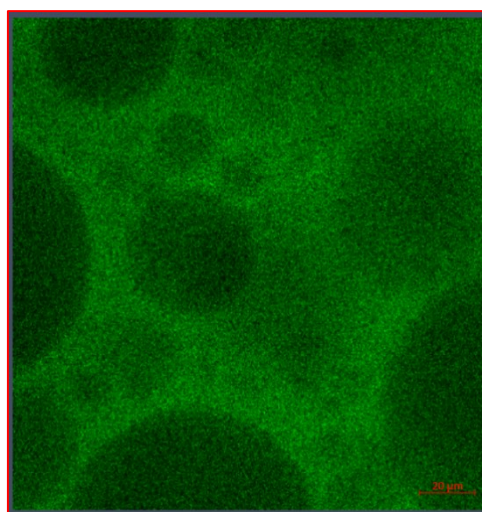
貫通孔が確認できた。(Fig.3-5-13)

ElastinA:ElastinE=10:90

3D image



2D image



3D image 断面図

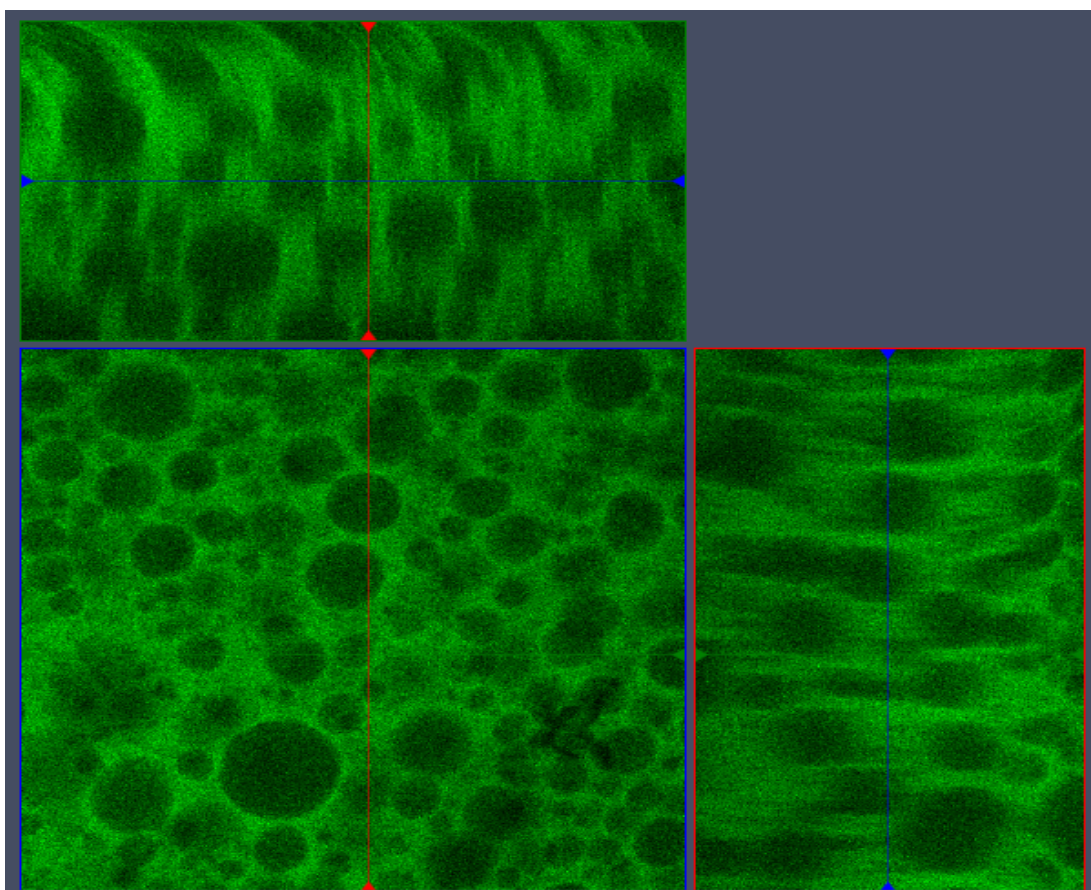


Fig.3-5-14 ElastinA:ElastinE=10:90 Gel の 2 次元・3 次元画像

貫通孔が確認できた。(Fig.3-5-14)

3-5-5 平均孔径の測定

共焦点レーザー顕微鏡で撮影した ElastinA+ElastinE Gel の画像中の孔の直径を ImageJ を用いて解析し、平均孔径を求めた。

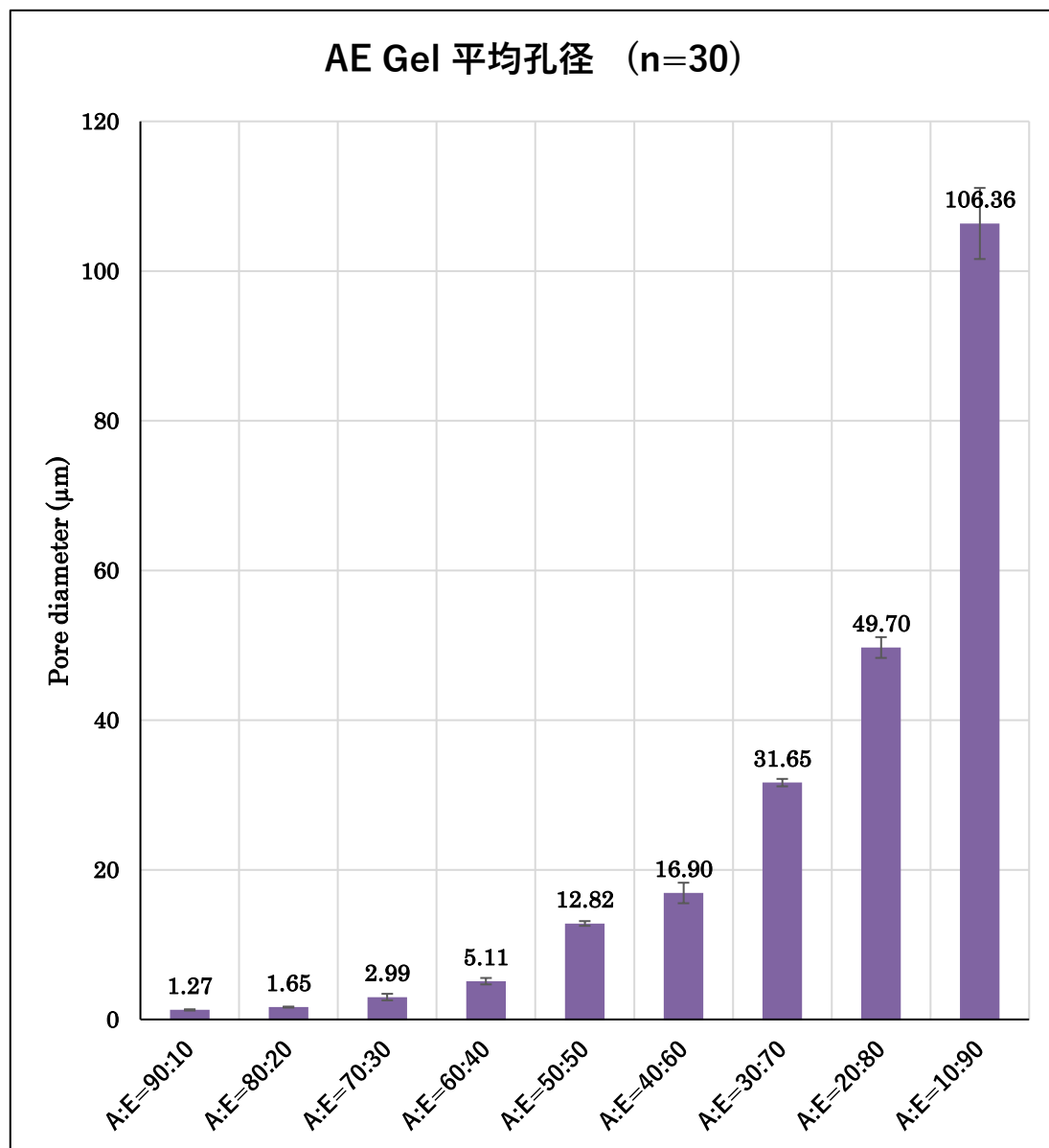


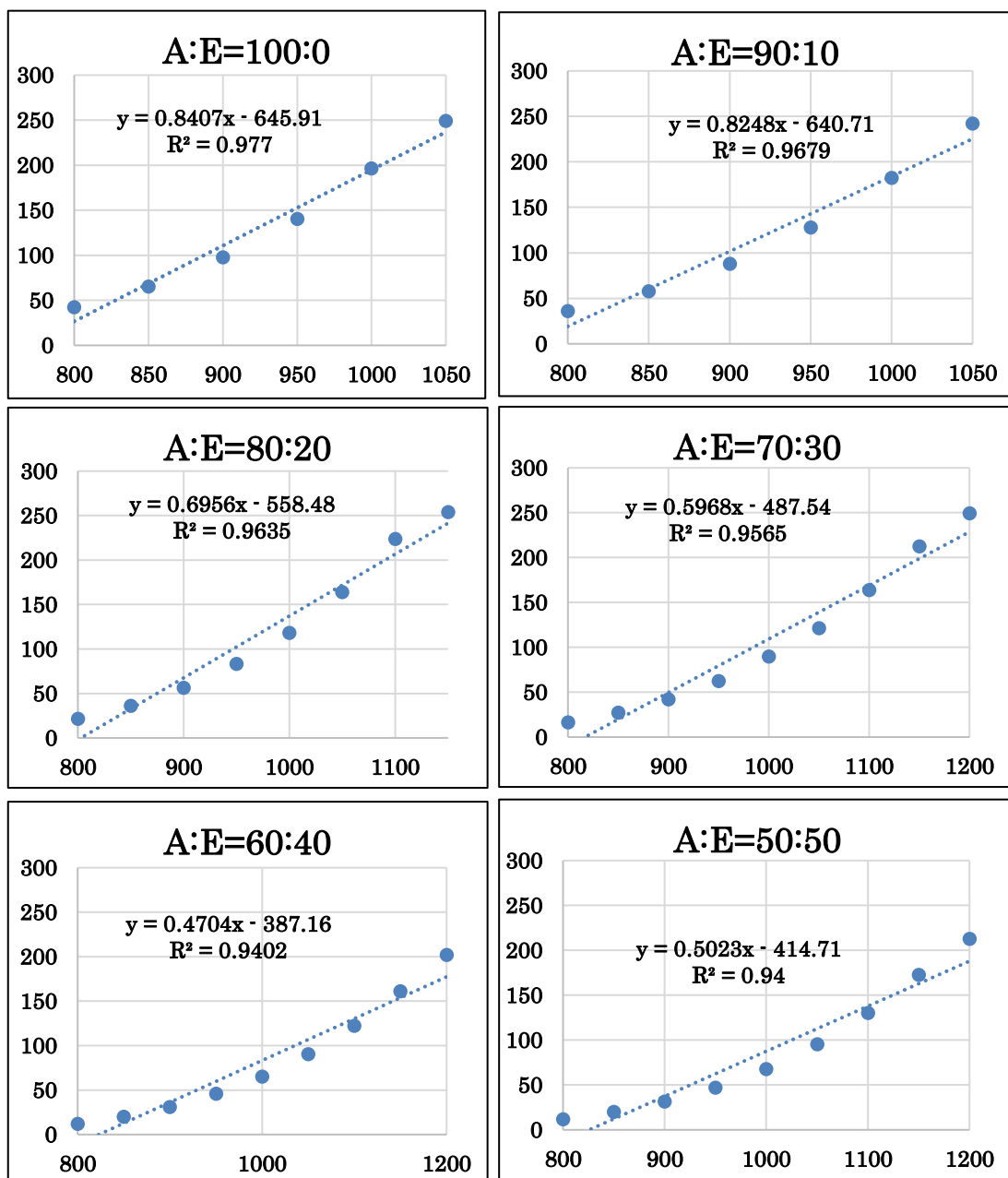
Fig.3-5-15 ElastinA+ElastinE Gel 平均孔径

ElastinE の割合が高くなるにつれて、平均孔径は大きくなる傾向であった。(Fig.3-5-15)

3-5-6 AE Gel の輝度解析

AE Gel は ElastinA と ElastinE の混合比率によって平均孔径が変化することが分かった。AE Gel を作製し脱イオン水で洗浄した後、自家蛍光により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。撮影時に輝度を変化させる Gain(Master)の値を 50 刻みで変化させそれぞれ画像を撮影した。撮影後画像解析ソフト「ZEN」を用いて、画像のヒストグラムで表示される算術平均輝度(Arithmetic mean intensity)を記録した。(Fig.3-5-16) 解析結果より輝度と ElastinA の含有率の検量線を作成した。

縦軸 : Arithmetic mean intensity (AMI)、横軸 : Gain(Master)



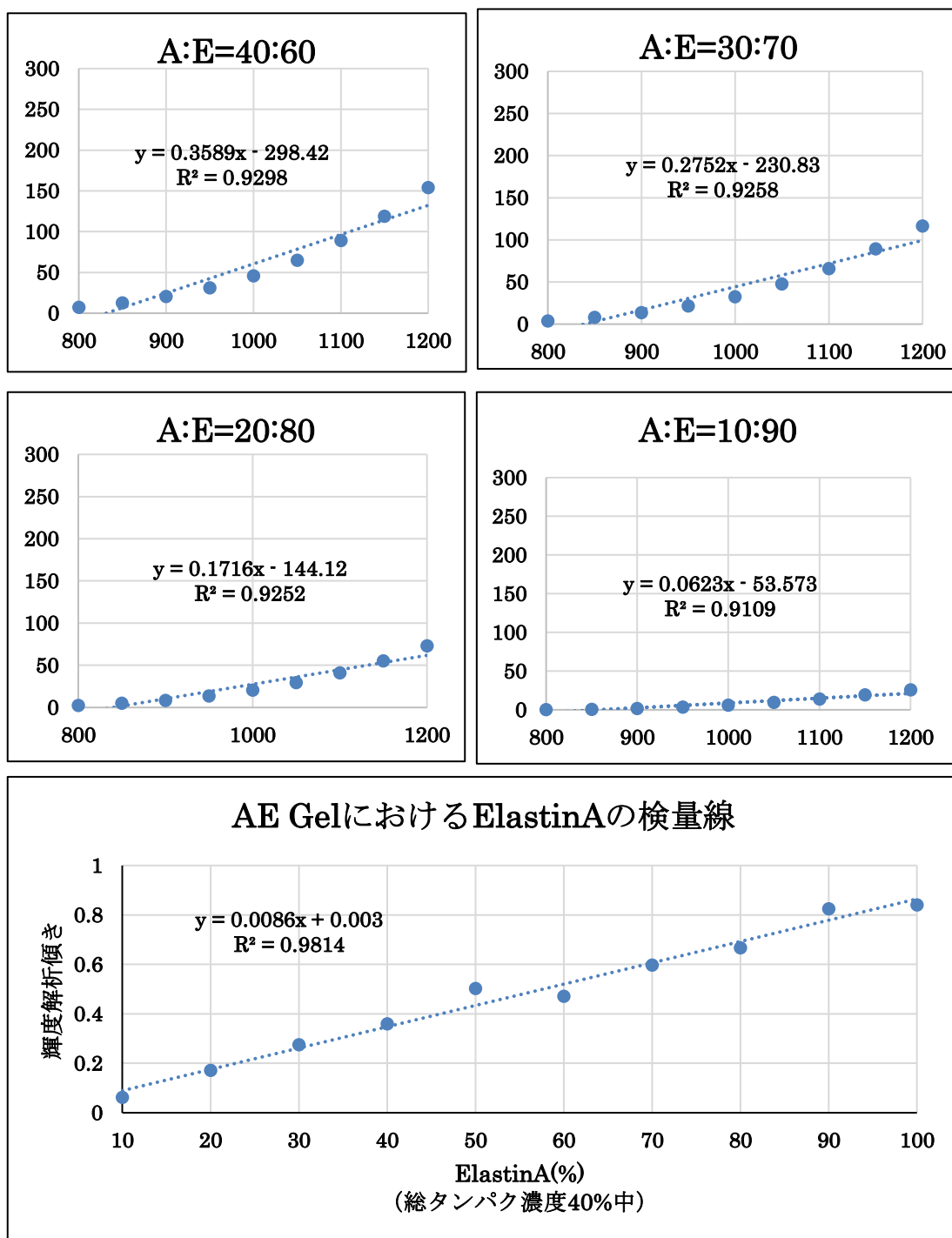


Fig.3-5-16 ElastinA+ElastinE Gel の輝度解析と検量線

ElastinA の含有率が高いほど算術平均輝度は高くなり、Gain(Master)を高くしていった際のプロットの傾きも大きくなっていることが分かった。輝度解析での傾きとGel 中の ElastinA 含有率の間には高い相関が見られることが分かった。(Fig.3-5-16)

3-5-7 空隙率の測定

共焦点レーザー顕微鏡で撮影した ElastinA+ElastinE Gel の空隙率(%)を ImageJ を用いて解析した。

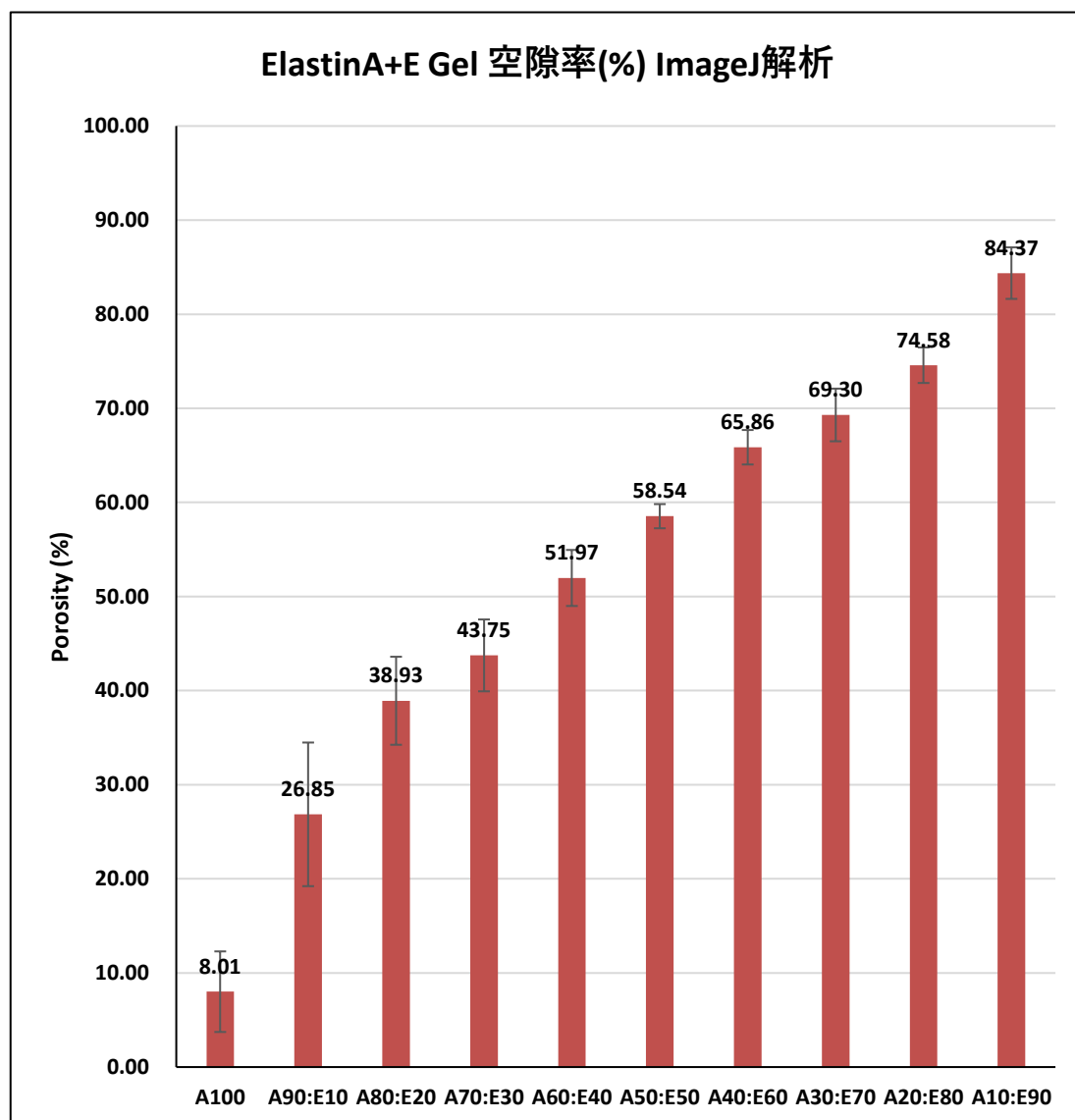


Fig.3-5-17 ImageJ より解析した ElastinA+ElastinE Gel 空隙率

ElastinE の割合が高くなるにつれて空隙率は上昇していく傾向であった。(Fig.3-5-17)

Fig.3-39 で求めた各 AE Gel の輝度の変化による傾きを用いて、ElastinA+ElastinE Gel の空隙率を解析した。ElastinA:E=100:0 は空隙率 0%として、各 AE Gel の空隙率(%)を解析した。

$$\text{空隙率(\%)} = 100 - (\text{各混合ゲルの傾き} / \text{ElastinA:E=100:0 ゲルの傾き}) \times 100$$

	100:0	90:1	80:2	70:30	60:40	50:5	40:60	30:70	20:80	10:9
		0	0			0				0
傾き	0.840	0.82	0.66	0.596	0.4704	0.50	0.358	0.275	0.171	0.06
	7	48	72	8		23	9	2	6	23
空隙率 (%)	0	1.89	20.6	29.01	44.05	40.2	57.31	67.27	79.59	92.5
			4			5				9

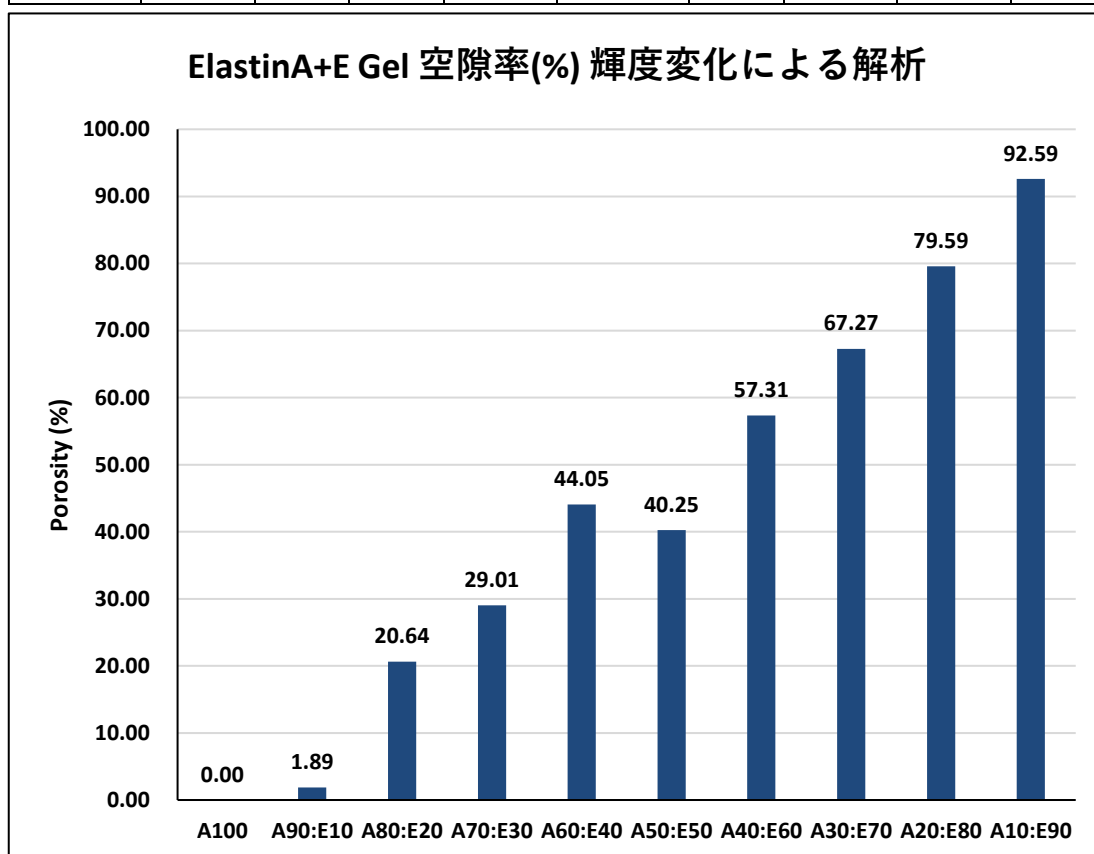


Fig.3-5-18 輝度変化による傾きより算出した ElastinA+ElastinE Gel 空隙率

輝度変化より求めた空隙率も ElastinE の割合が高くなるにつれて上昇していく傾向であった。(Fig.3-5-18)

Fig.3-5-17、Fig.3-5-18 のように異なる空隙率の算出方法によって出された値が正確であるかを確認するために2つの値の相関を求めた。

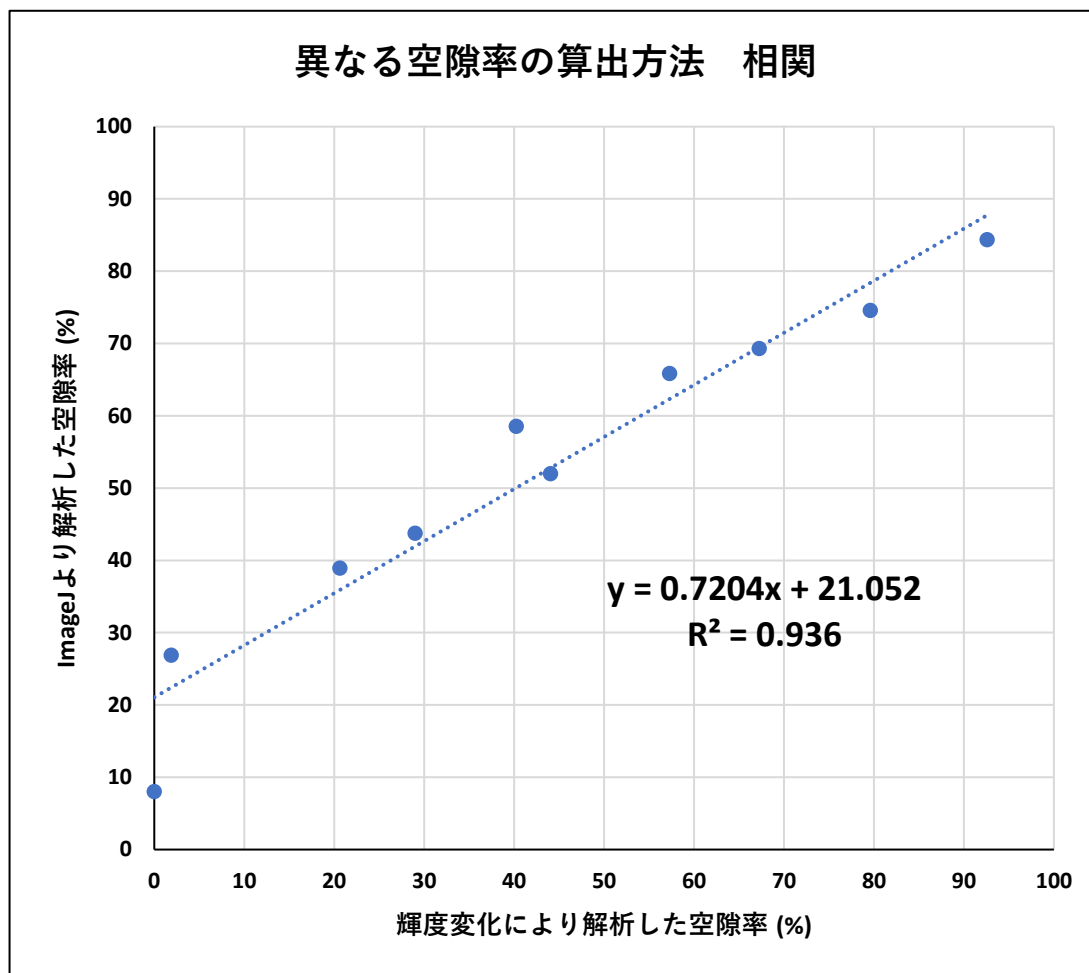


Fig.3-5-19 ImageJ 解析と輝度変化による解析との空隙率の相関

線形近似曲線を作製したところ R^2 も 0.9 を超えていたため 2 つの空隙率の算出方法の間には相関関係があることが分かった。(Fig.3-5-19)

3-5-8 動物実験による Elastin Gel の生体適合性の確認

オペ後、1 週間と 6 週間後にウサギの背中の状態を確認したが腫れや炎症などは確認できなかった。また、6 週間後には手術部を触診したが Elastin Gel は確認できなかった。生体内に入れることで Elastin Gel は分解されることが分かった。

3-6 高温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の評価 (AX Gel)

ElastinA と Fibrillin-X の混合比率を変化させた Hybrid Gel を作製し、弾性率と伸長率を測定した。低温架橋により Fibrillin Gel を作製し、力学的強度測定及び膨潤度測定を行った。ゲルの作製条件は Table.3-6-1 に示した。

Table.3-6-1 高温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製条件

ElaA:FibX	100:0	90:10	80:20	70:30	60:40	50:50	40:60	30:70	20:80	10:90
ElastinA (mg)	48	43.2	38.4	33.6	28.8	24	19.2	14.4	9.6	4.8
Fibrillin-X (mg)	0	4.8	9.6	14.4	19.2	24	28.8	33.6	38.4	43.2
Milli-Q (μl)	53.03	53.03	53.03	53.03	53.03	53.03	53.03	53.03	53.03	53.03
Dode-DSP (340.3mM) (μl)	18.97	18.97	18.97	18.97	18.97	18.97	18.97	18.97	18.97	18.97

3-6-1 力学的強度測定

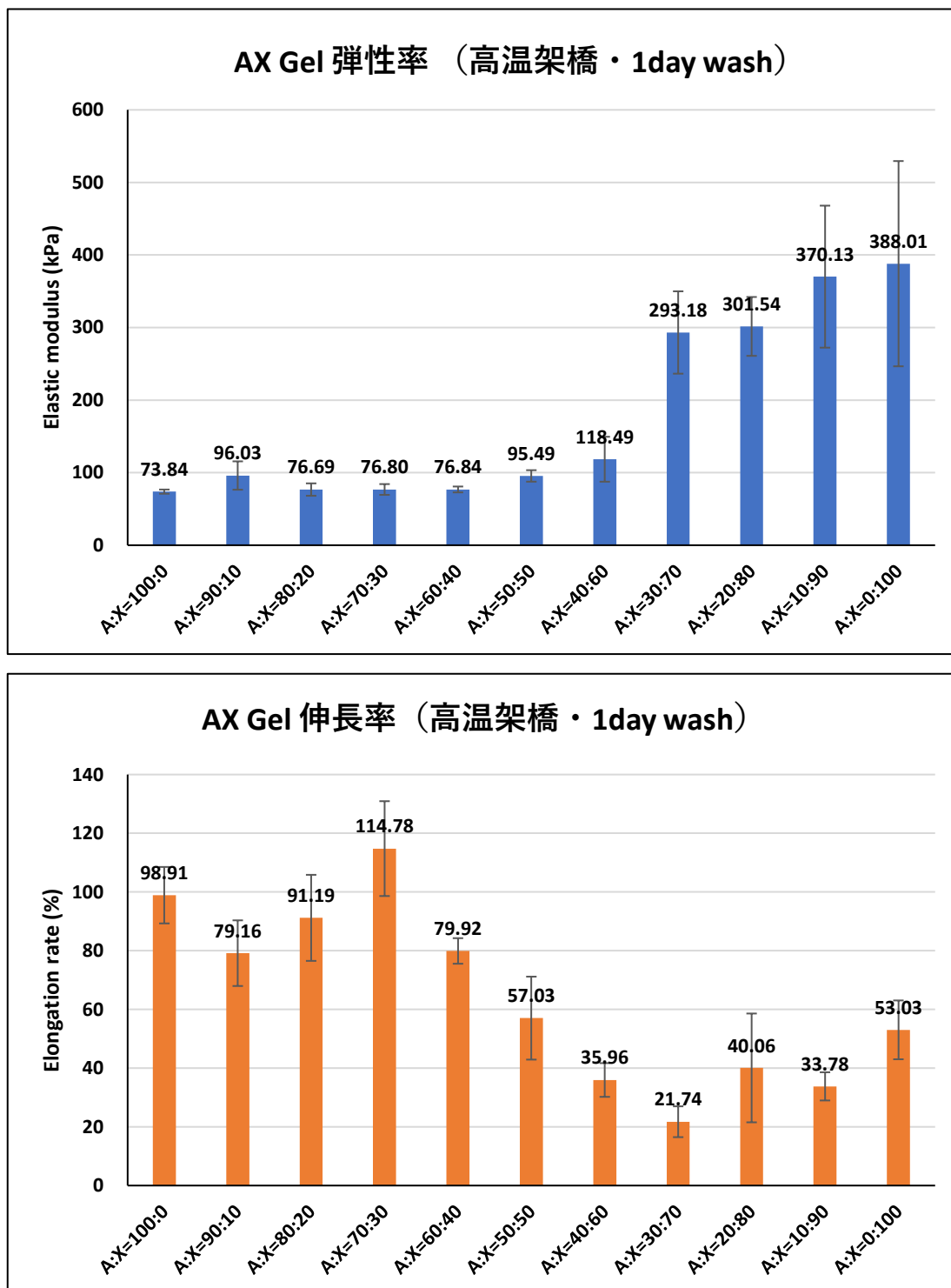


Fig.3-6-1 高温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の弾性率・伸長率(1day wash)

Fibrillin-X の混合比率が高くなるにつれて弾性率は上昇し、伸長率は減少するという傾向であった。(Fig.3-6-1)

3-6-2 膨潤度測定

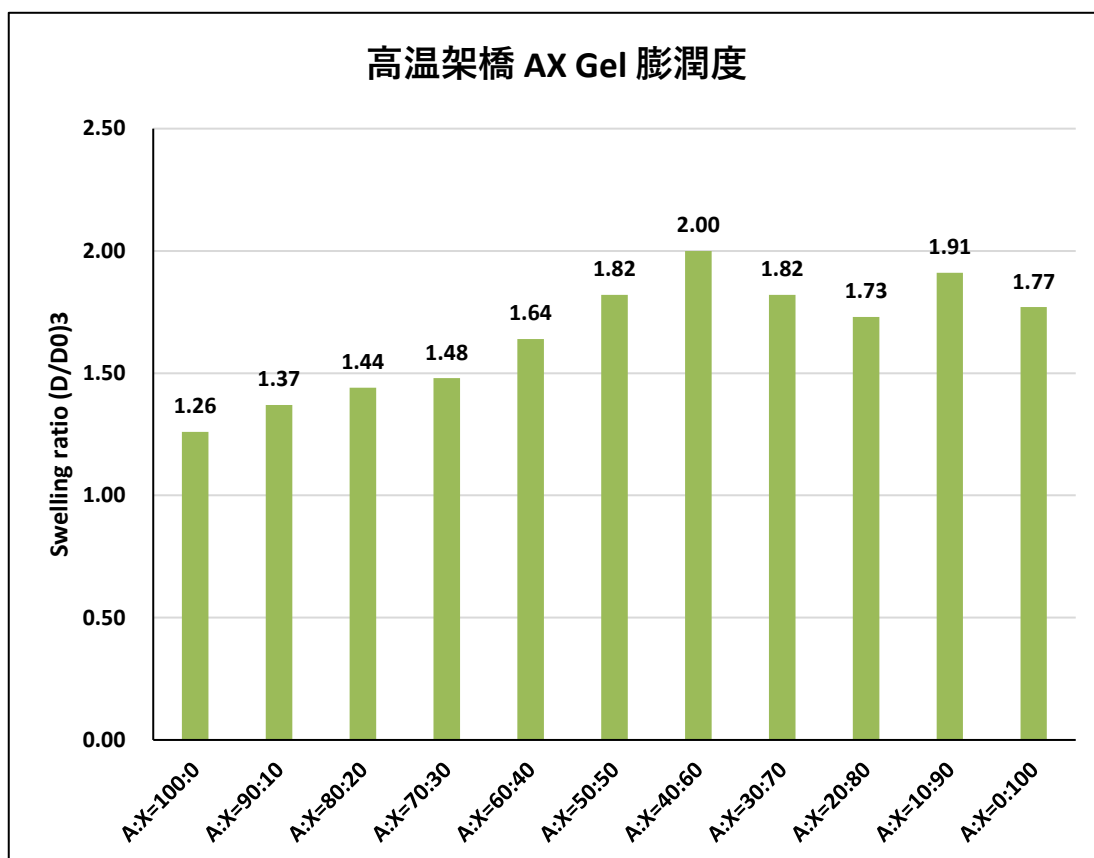


Fig.3-6-2 高温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の膨潤度

膨潤度は Fibrillin の割合が高いほど膨潤度が高くなっていた。(Fig.3-6-2)

3-6-3 異なる架橋倍率の Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製

異なる濃度の Dode-DSP を添加して ElastinA ゲル、Fibrillin-X ゲル、ElastinA-Fibrillin-X Hybrid Gel ゲルを作製し力学的強度測定を行った。

コントロールは Elastin Gel を作製する際の濃度 (Elastin に対して架橋倍率 2 倍) とし、その他は Fibrillin のアミノ基に対して架橋倍率が 0.25 倍、0.50 倍、0.75 倍、1.0 倍となるような濃度にした。ゲルの作製条件は Table.3-6-2, 3, 4 に示した。

Table.3-6-2 ElastinA Gel の作製条件

	control	0.25 倍	0.5 倍	0.75 倍	1.0 倍
ElastinA(mg)	48	48	48	48	48
Dode-DSP(μ l)	18.07 (340.3mM)	10.09 (1000mM)	20.18 (1000mM)	30.27 (1000mM)	40.35 (1000mM)
Milli-Q(μ l)	53.03	61.91	51.82	41.73	31.65

Table.3-6-3 Fibrillin-X Gel の作製条件

	control	0.25 倍	0.5 倍	0.75 倍	1.0 倍
Fibrillin-X(mg)	48	48	48	48	48
Dode-DSP(μ l)	18.07 (340.3mM)	10.09 (1000mM)	20.18 (1000mM)	30.27 (1000mM)	40.35 (1000mM)
Milli-Q(μ l)	53.03	61.91	51.82	41.73	31.65

Table.3-6-4 ElastinA-Fibrillin-X Hybrid Gel の作製条件

	control	0.25 倍	0.5 倍	0.75 倍	1.0 倍
ElastinA(mg)	24	24	24	24	24
Fibrillin-X(mg)	24	24	24	24	24
Dode-DSP(μ l)	18.07 (340.3mM)	10.09 (1000mM)	20.18 (1000mM)	30.27 (1000mM)	40.35 (1000mM)
Milli-Q(μ l)	53.03	61.91	51.82	41.73	31.65

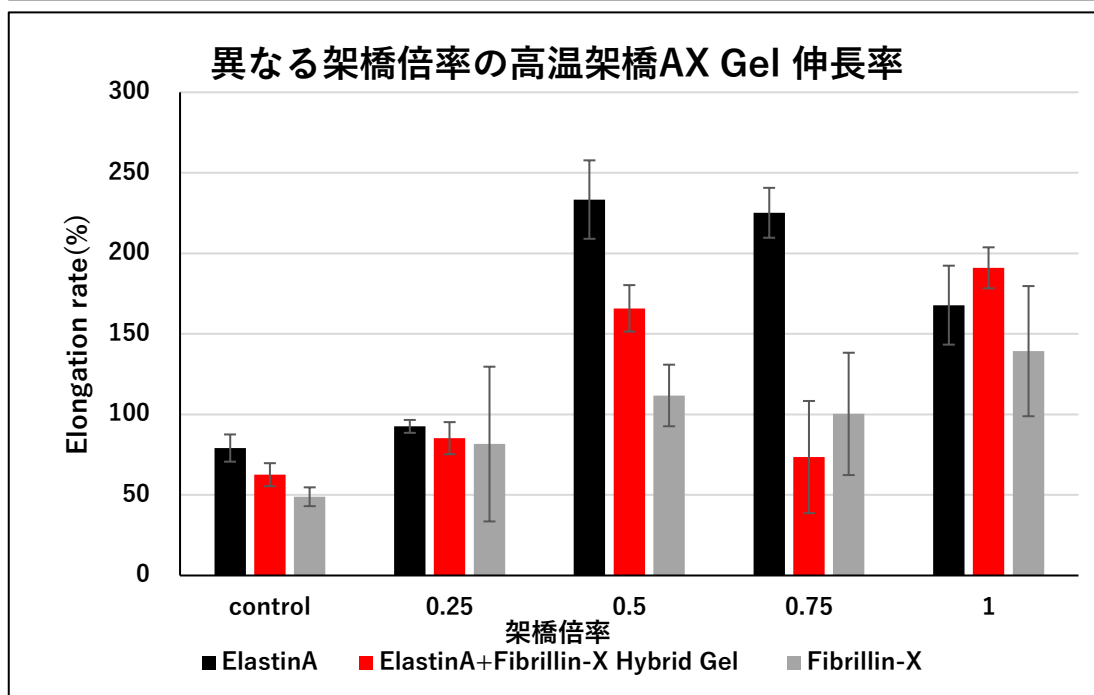
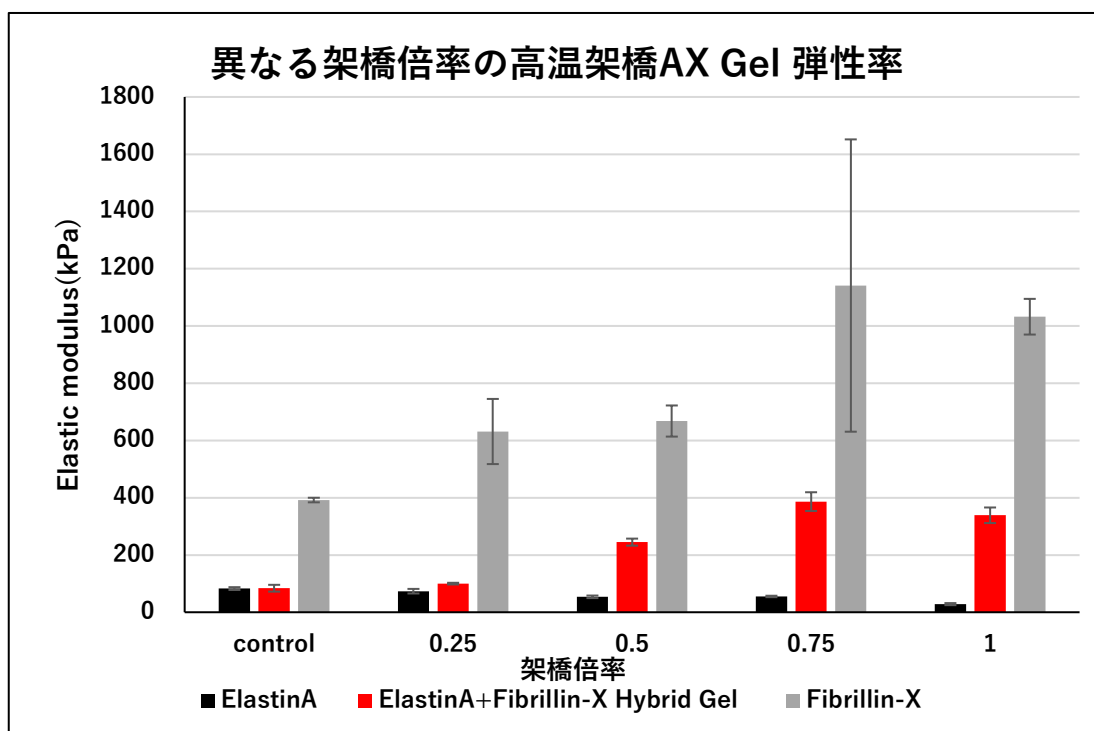


Fig.3-6-3 異なる架橋倍率の高温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel 弾性率・伸長率

ElastinA Gel は架橋倍率が高くなるほど弾性率が減少し、伸長率が上昇した。Fibrillin-X Gel は架橋倍率が高くなるほど弾性率が上昇し、伸長率も上昇した。Elastin-Fibrillin Hybrid Gel は架橋倍率が高くなるほど弾性率が上昇し、伸長率も上昇し最も高くなった。(Fig.3-6-3)

3-7 低温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の評価 (AX Gel)

低温架橋により Fibrillin-Fibrillin Hybrid Gel を作製し、力学的強度測定及び膨潤度測定を行った。ゲルの作製条件は Table.3-7-1 に示した。

力学的強度測定はゲル作製後、取り出した直後のゲル(Fig.3-7-1)で行った。膨潤度測定は 1 日脱イオン水に浸した後の直径: D とゲルを取り出してすぐの直径: D_0 を測定し、 $(D/D_0)^3$ で求めた。(Fig.3-7-2)

Table.3-7-1 低温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製条件

A:X	0:100	10:90	20:80	30:70	40:60	50:50	60:40	70:30	80:20	90:10	100:0
ElastinA	0	4.8	9.6	14.4	19.2	24	28.8	33.6	38.4	43.2	48
Fibrillin-X	48	43.2	38.4	33.6	28.8	24	19.2	14.4	9.6	4.8	0
Dode-DSP (1000mM)	20.18	20.18	20.18	20.18	20.18	20.18	20.18	20.18	20.18	20.18	20.18
Milli-Q	40.3	40.3	40.3	40.3	40.3	40.3	40.3	40.3	40.3	40.3	40.3
Na ₂ CO ₃ aq (500mM)	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52

3-7-1 力学的強度測定

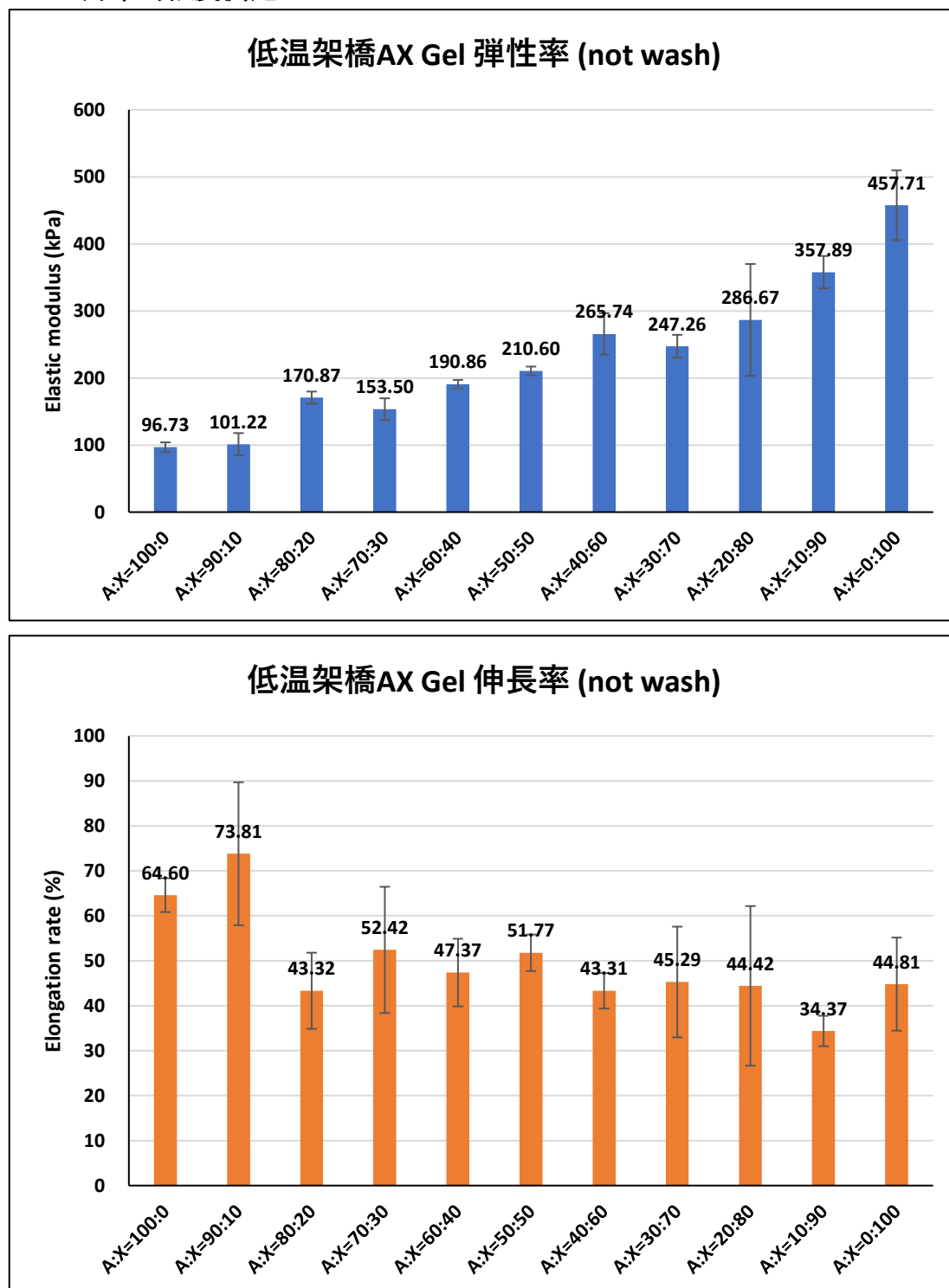


Fig.3-7-1 低温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の弾性率・伸長率

Fibrillin-X の混合比率が高くなるにつれて弾性率は上昇し、伸長率はあまり変化しなかった。(Fig.3-7-1)

3-7-2 膨潤度測定

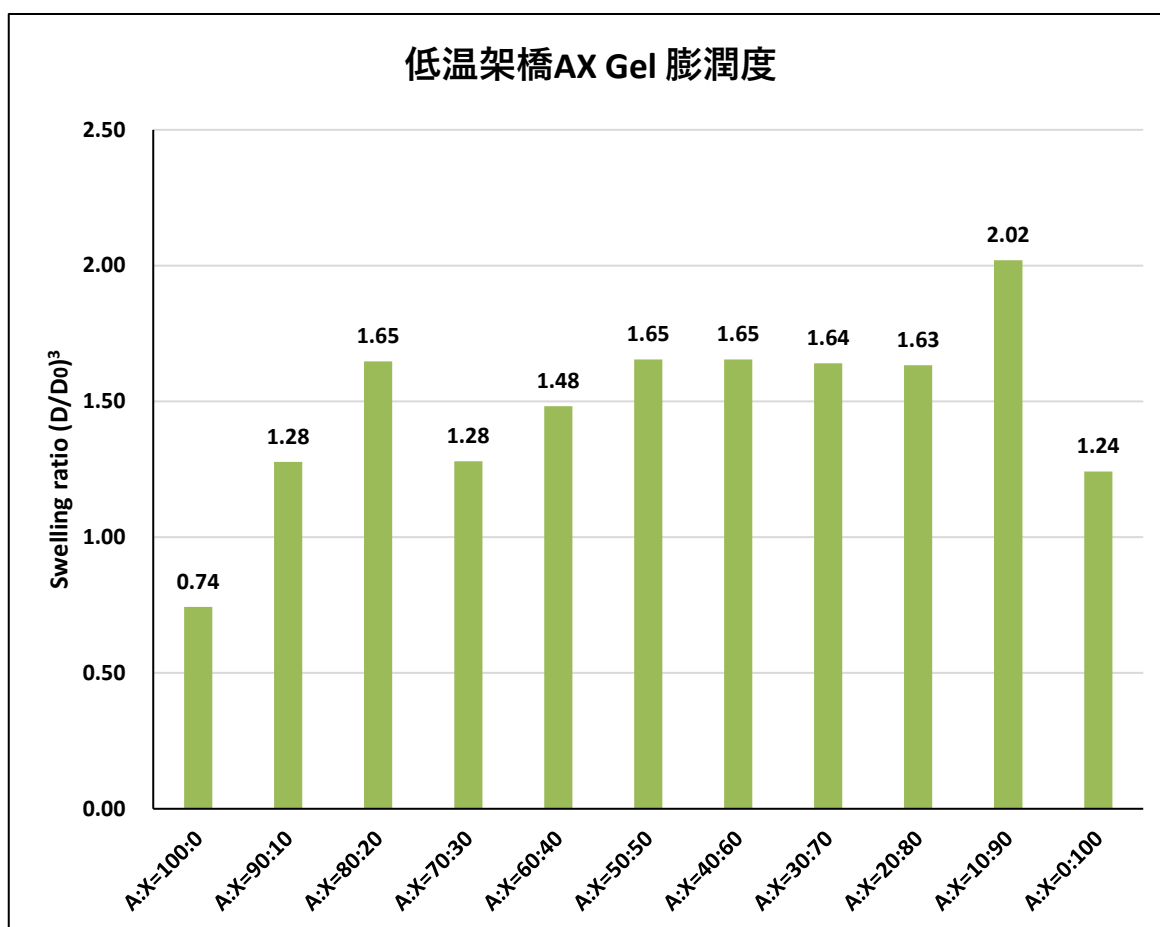


Fig.3-7-2 低温架橋 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の膨潤度

一部例外はあるが、膨潤度はどのゲルもほぼ変化はなかった。(Fig.3-7-2)

3-7-3 異なるインキュベート温度による力学的強度の変化

高濃度の Dode-DSP を添加し 37°C でインキュベートしたゲルと 4°C の冷蔵庫でインキュベートしたゲル、低濃度の Dode-DSP を添加し 37°C でインキュベートした3種類のゲルの力学的強度を測定した。作製してからキャピラリーから取り出さずに測定の前で取り出し測定した。Gel の作製条件は Table.3-7-2 に示した。

Table.3-7-2 Gel の作製条件

	高濃度 Dode-DSP (High)		低濃度 Dode-DSP (Low)
ElastinA(mg)	24	ElastinA(mg)	24
Fibrillin-X (mg)	24	Fibrillin-X (mg)	24
Dode-DSP (μl) (1000mM)	40.35	Dode-DSP (μl) (345.8mM)	18.67
Milli-Q(μl)	20.13	Milli-Q	41.81
Na ₂ CO ₃ aq(μl) (500mM)	11.52	Na ₂ CO ₃ aq(μl) (500mM)	11.52

高濃度 Dode-DSP Gel (High)・・・37°C、冷蔵庫(4°C)

低濃度 Dode-DSP Gel (Low)・・・37°C

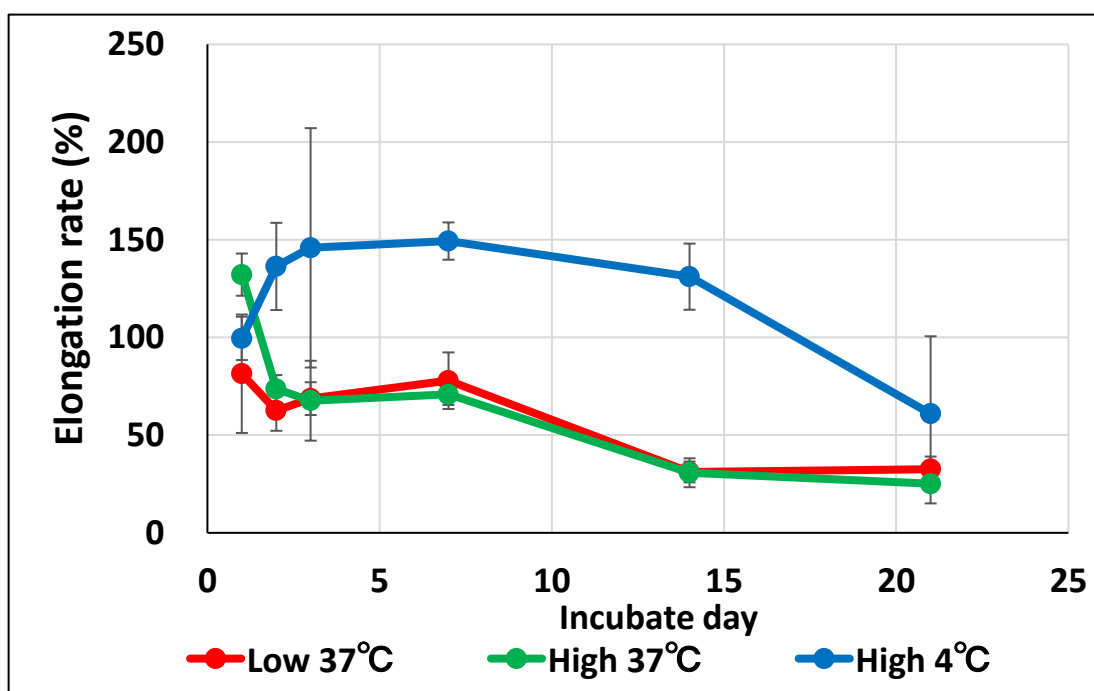
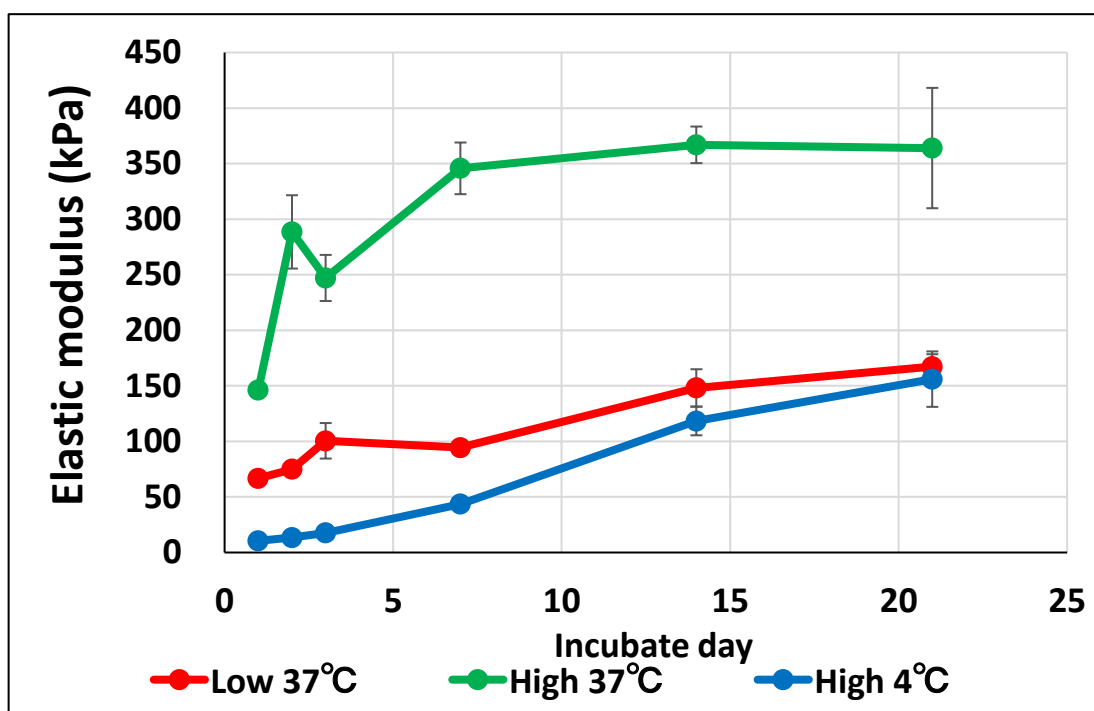


Fig.3-7-3 異なるインキュベート温度による力学的強度の変化

どのゲルもインキュベート日数が経つほどに弾性率は上昇し、伸長率は減少していく傾向であった。また、4°Cでインキュベートしたゲルは 37°Cでインキュベートした同一のゲル(High)よりも弾性率の上昇が遅かった。(Fig.3-7-3)

3-7-4 異なる加速剤濃度の Gel の力学的強度変化

異なる加速剤濃度の ElastinA-Fibrillin-X Hybrid Gel を高濃度の Dode-DSP を添加した低温架橋で作製し、力学的強度を測定した。作製して1日インキュベート後 (0day wash)、1day、7day、14day wash 後のゲルの力学的強度測定した。ゲルの作製条件は Table.3-7-3 に示した。

Table.3-7-3 Gel の作製条件

	20mM	40mM	80mM	120mM	160mM
ElastinA(mg)	24	24	24	24	24
Fibrillin-X (mg)	24	24	24	24	24
Dode-DSP (μ l) (1000mM)	40.35	40.35	40.35	40.35	40.35
Milli-Q(μ l)	28.77	25.89	20.13	14.37	8.61
Na ₂ CO ₃ aq(μ l) (500mM)	2.88	5.76	11.52	17.28	23.04

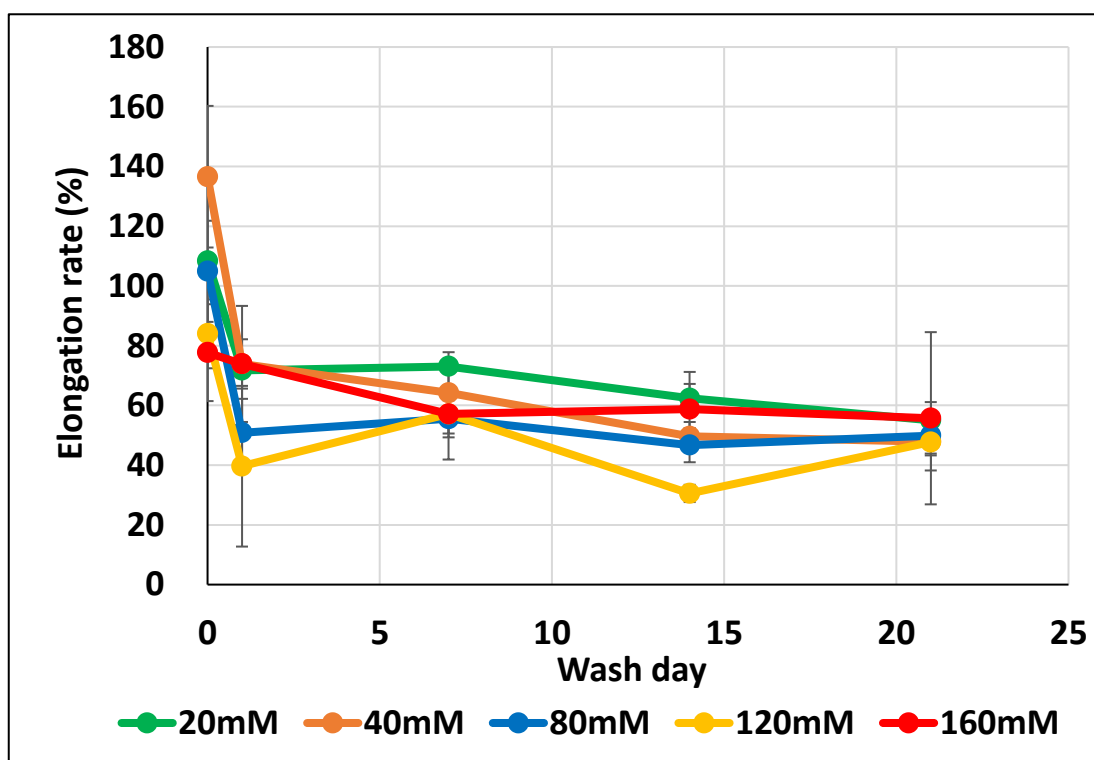
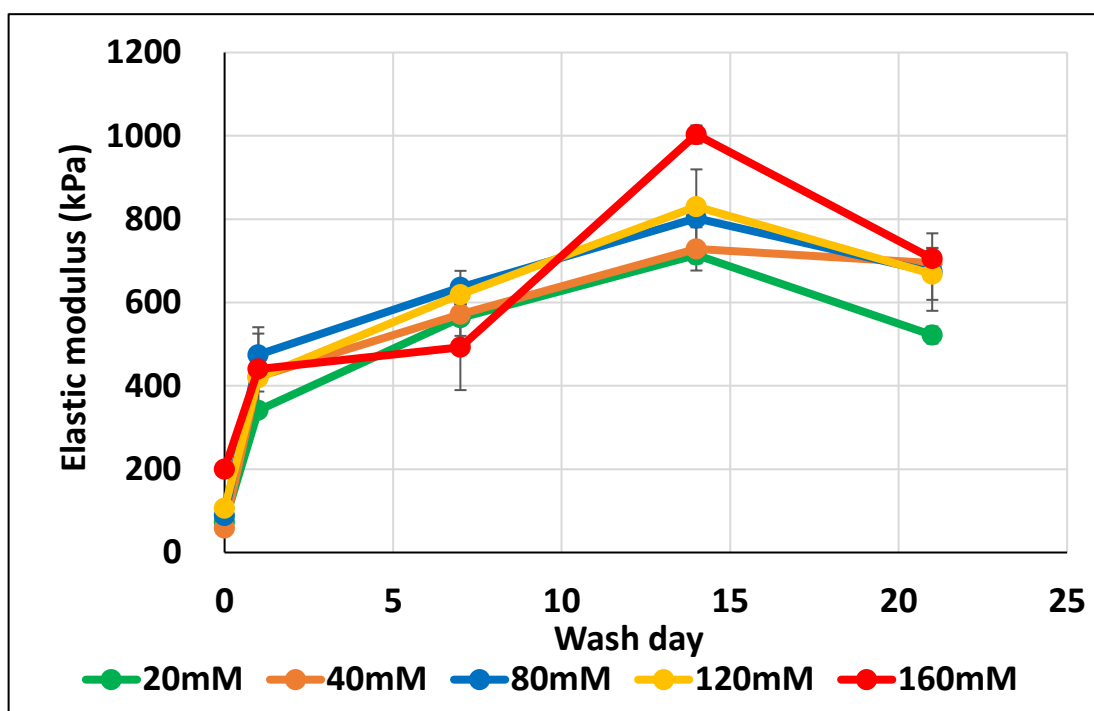


Fig.3-7-4 異なる加速剤濃度の Gel の力学的強度変化

どのゲルも洗浄日数が経つほどに弾性率は上昇し、伸長率は減少していく傾向であった。加速剤濃度の違いによる値の差は大きくはなかった。(Fig.3-7-4)

3-7-5 異なる架橋剤濃度の Gel の力学的強度変化(後付け架橋)

ゲルを各濃度に調整した Dode-DSP 水溶液にゲルを浸し力学的強度の測定を行った。Dode-DSP は 1,10,30,50mM の 4 種類を作製した。また、ゲルは架橋剤濃度が低いものと高いものの 2 種類を作製した。(Low=Elastin での架橋倍率 2 倍 [53.77mM]、High=Fibrillin での架橋倍率 1 倍 [336.25mM]) Gel の作製条件は Table.3-7-4 に示した。

Table.3-7-4 Gel の作製条件

	高濃度 Dode-DSP (High)		低濃度 Dode-DSP (Low)
ElastinA(mg)	24	ElastinA(mg)	24
Fibrillin-X (mg)	24	Fibrillin-X (mg)	24
Dode-DSP (μl) (1000mM)	40.35	Dode-DSP (μl) (345.8mM)	18.67
Milli-Q(μl)	20.13	Milli-Q	41.81
Na ₂ CO ₃ aq(μl) (500mM)	11.52	Na ₂ CO ₃ aq(μl) (500mM)	11.52

ゲルを取り出した直後に測定した値は Table.3-7-5 に示した。

Table.3-7-5 取り出した直後の測定値

	弾性率(kPa)	伸長率(%)
低濃度 Dode-DSP Gel (Low)	66.76	81.42
高濃度 Dode-DSP Gel (High)	146.28	132.14

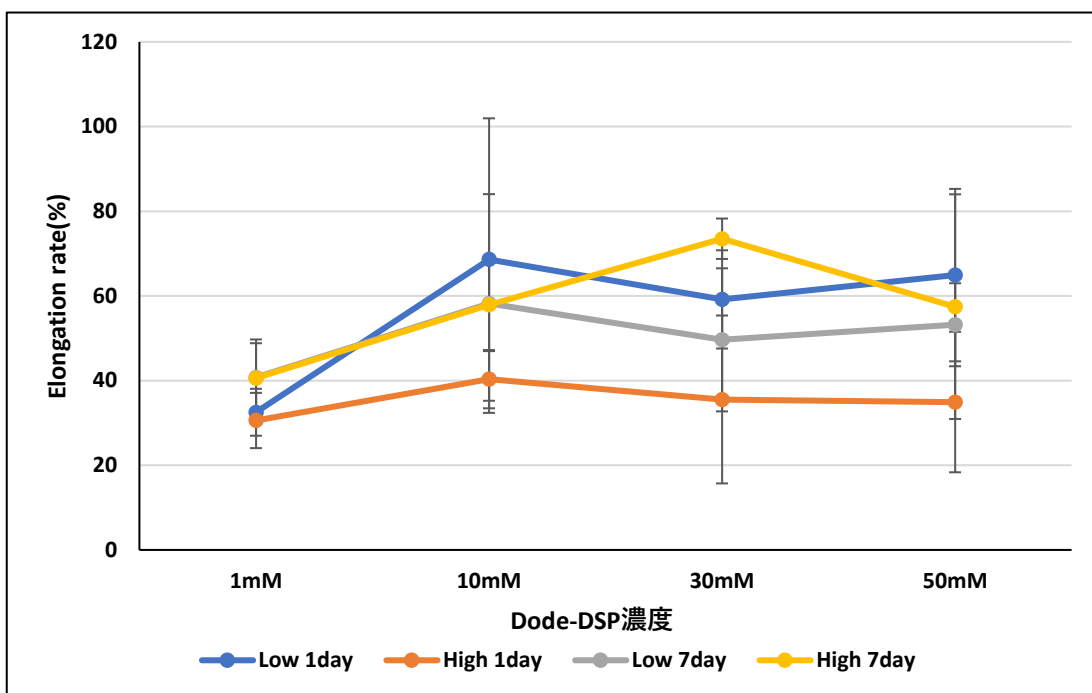
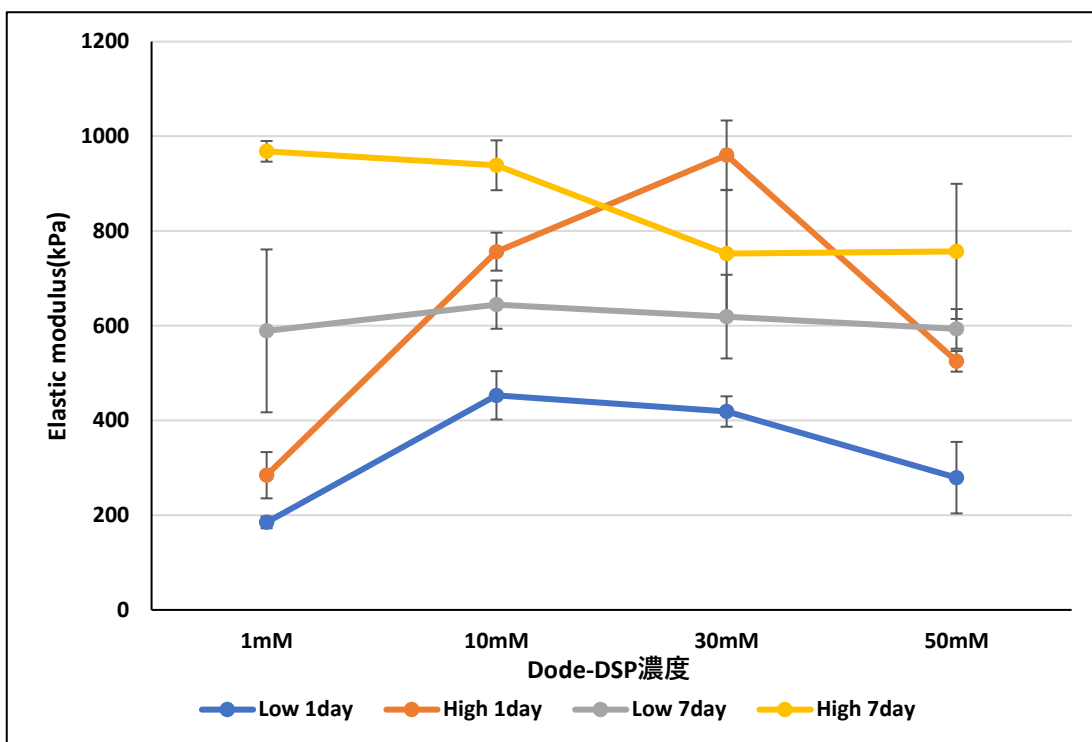


Fig.3-7-5 異なる架橋剤濃度で作製した Hybrid Gel の力学的強度変化

どのゲルも Dode-DSP 水溶液に浸すことで取り出した直後の値よりも弾性率の上昇が見られた。しかし、伸長率は減少していた。(Fig.3-7-5)

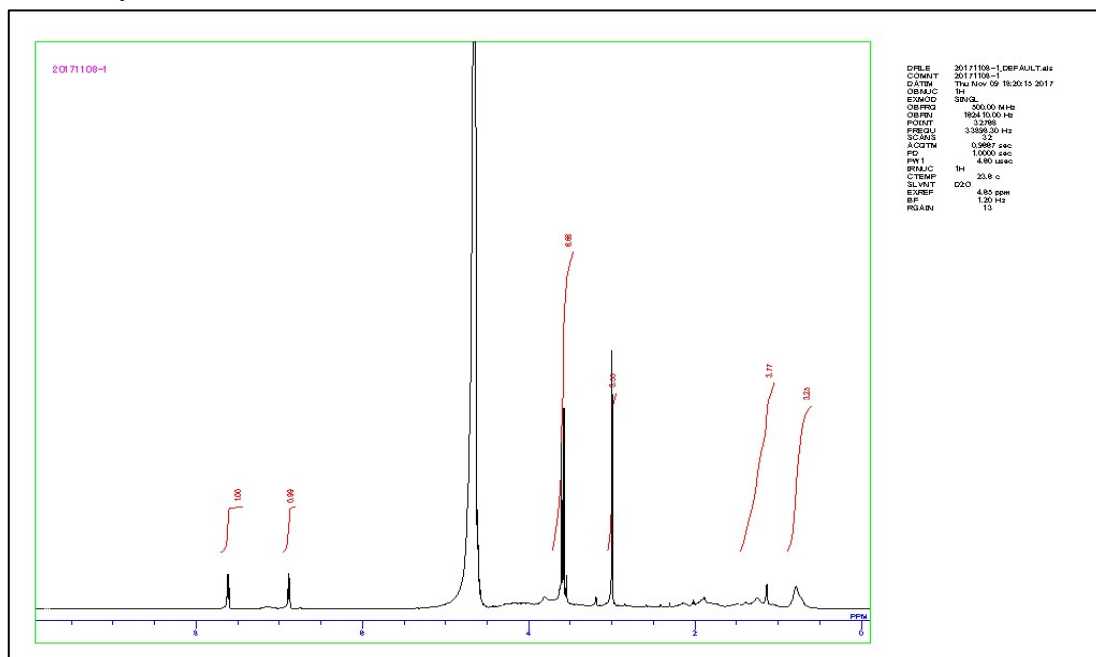
3-7-6 ゲル洗浄後溶液の NMR 測定

Table.3-7-6 に示した作製条件でゲルを作製し、脱イオン水に 1 日と 7 日間浸した。1 日、7 日後にゲルを浸した脱イオン水を回収し凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、D₂O を加え NMR で測定した。

Table.3-7-6 Gel の作製条件

	高濃度 Dode-DSP (High)		低濃度 Dode-DSP (Low)
ElastinA(mg)	24	ElastinA(mg)	24
Fibrillin-X (mg)	24	Fibrillin-X (mg)	24
Dode-DSP (μl) (1000mM)	40.35	Dode-DSP (μl) (345.8mM)	18.67
Milli-Q(μl)	20.13	Milli-Q	41.81
Na ₂ CO ₃ aq(μl) (500mM)	11.52	Na ₂ CO ₃ aq(μl) (500mM)	11.52

Low 1day wash



Low 7day wash

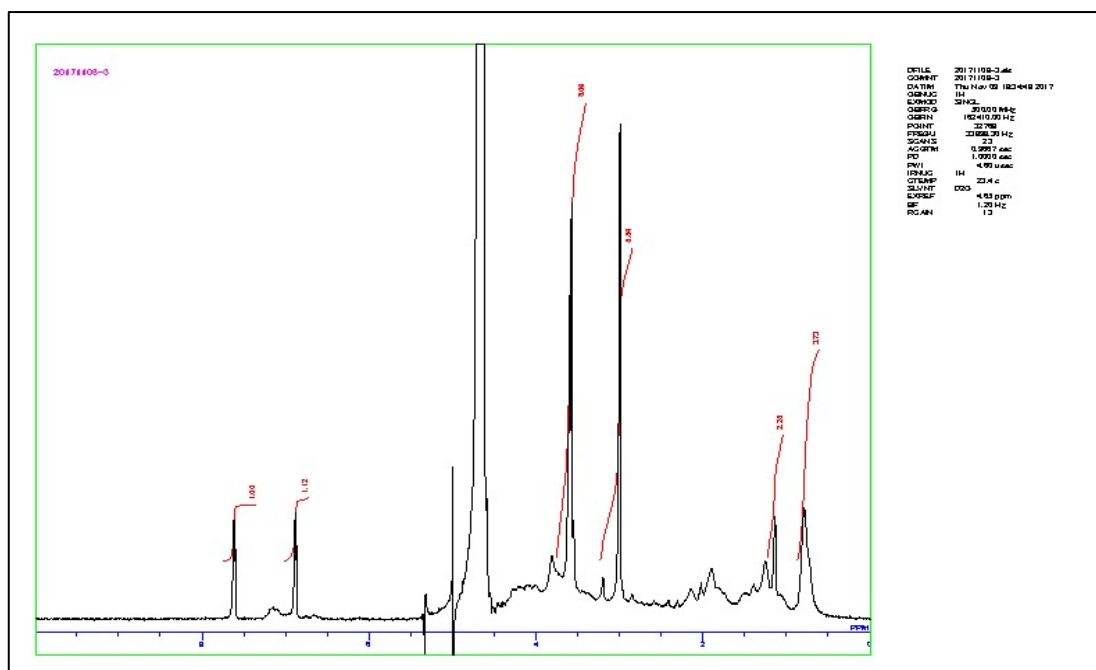
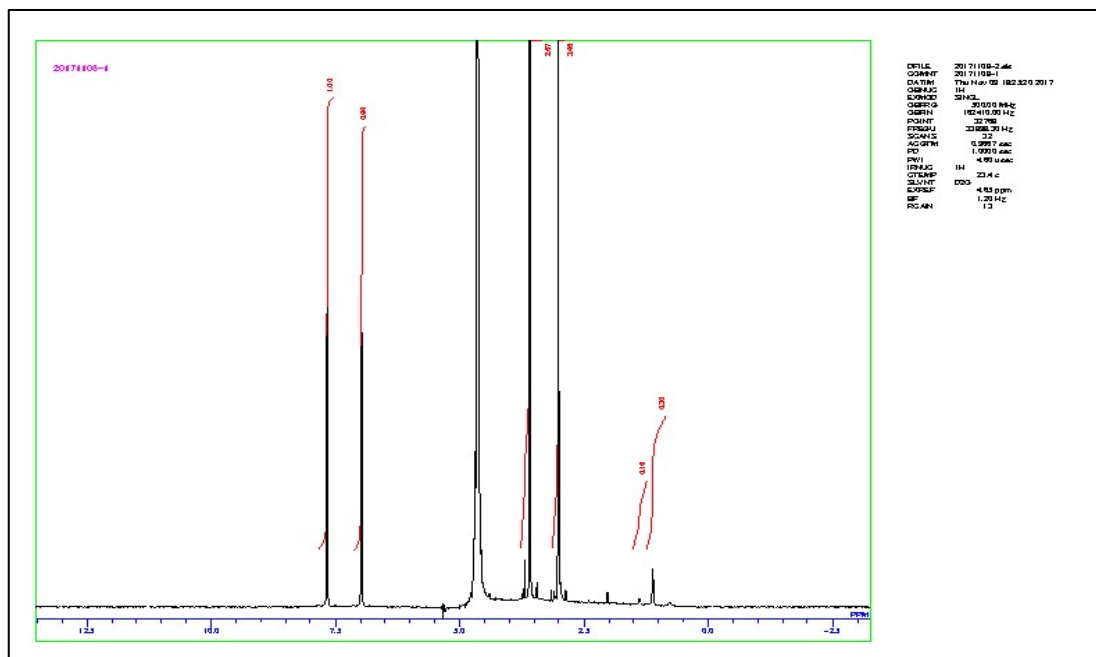


Fig.3-7-6 低濃度 Dode-DSP ゲルを浸した洗浄液の NMR 測定

DSP のピークが 7 日洗浄後で大きくなり、Elastin と思われるピークが検出された。(Fig.3-7-6)

High 1day wash



High 7day wash

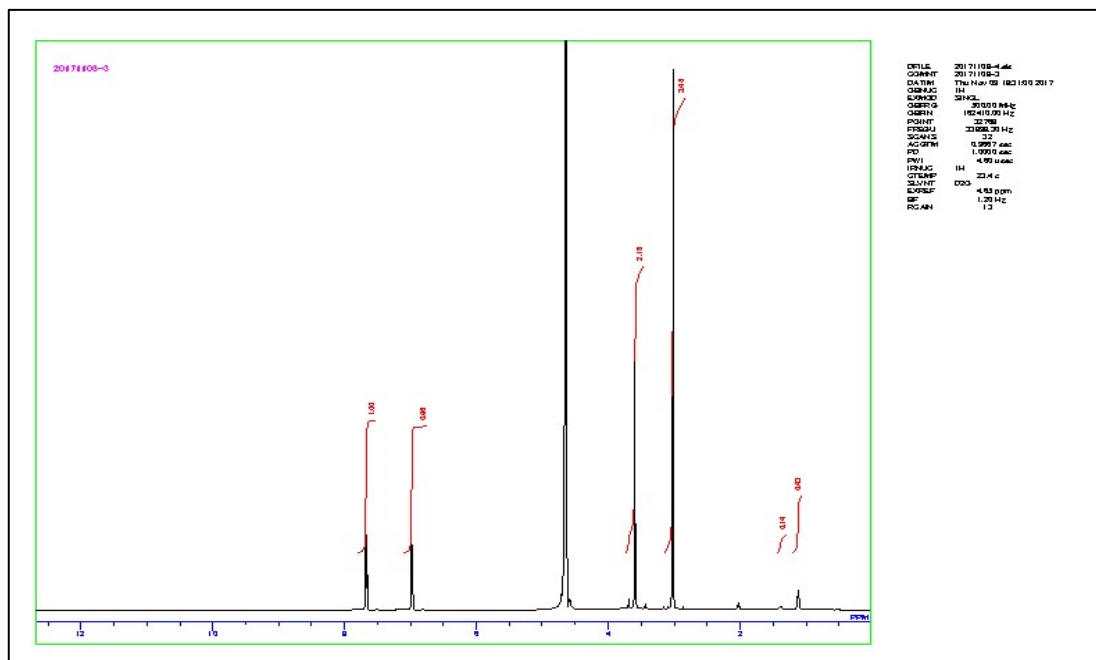


Fig.3-7-7 高濃度 Dode-DSP ゲルを浸した洗浄液の NMR 測定

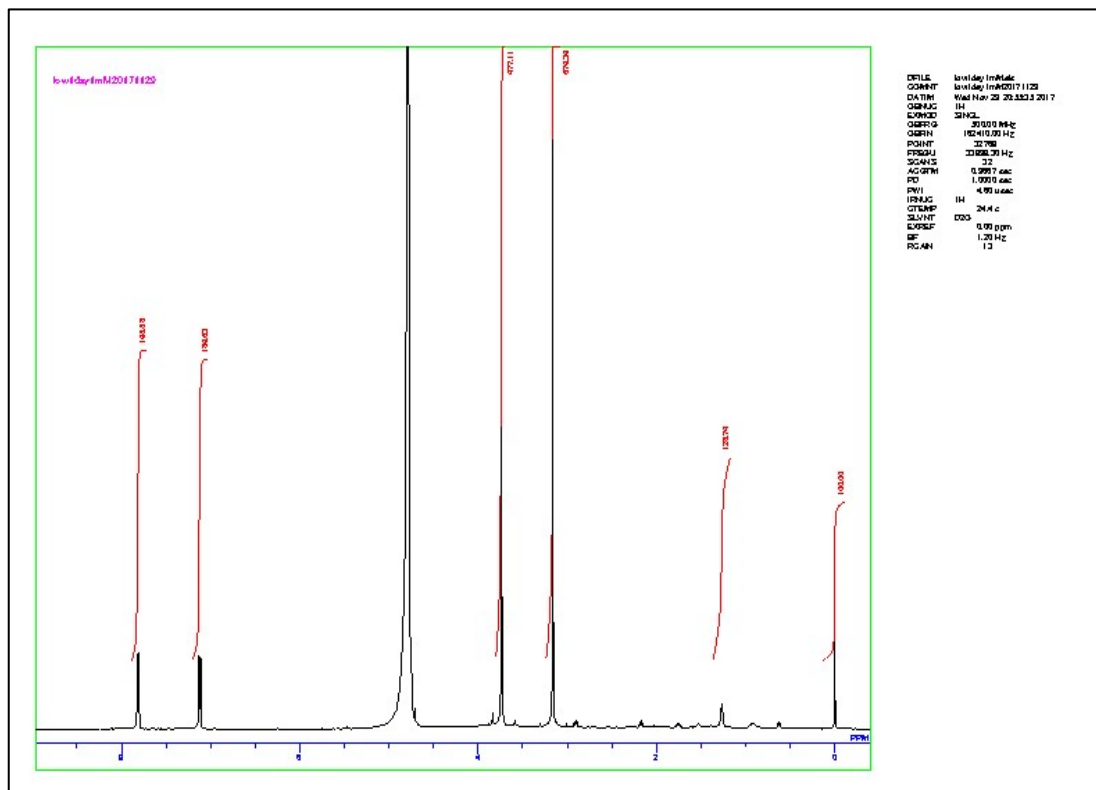
1 日目と 7 日目でピークに大きな変化はなかった。(Fig.3-7-7)

Table.3-7-7に示した作製条件でゲルを作製し、1mM, 10mM, 30mM, 50mM Dode-DSP 水溶液に1日と7日間浸した。1日、7日後にゲルを浸した Dode-DSP 水溶液を回収し、溶出した DSP の定量を行うため 3-(Trimethylsilyl)-1-propane-sulfonic acid, sodium salt (TSS) 溶液を加え凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、D₂O を加え NMR で測定した。

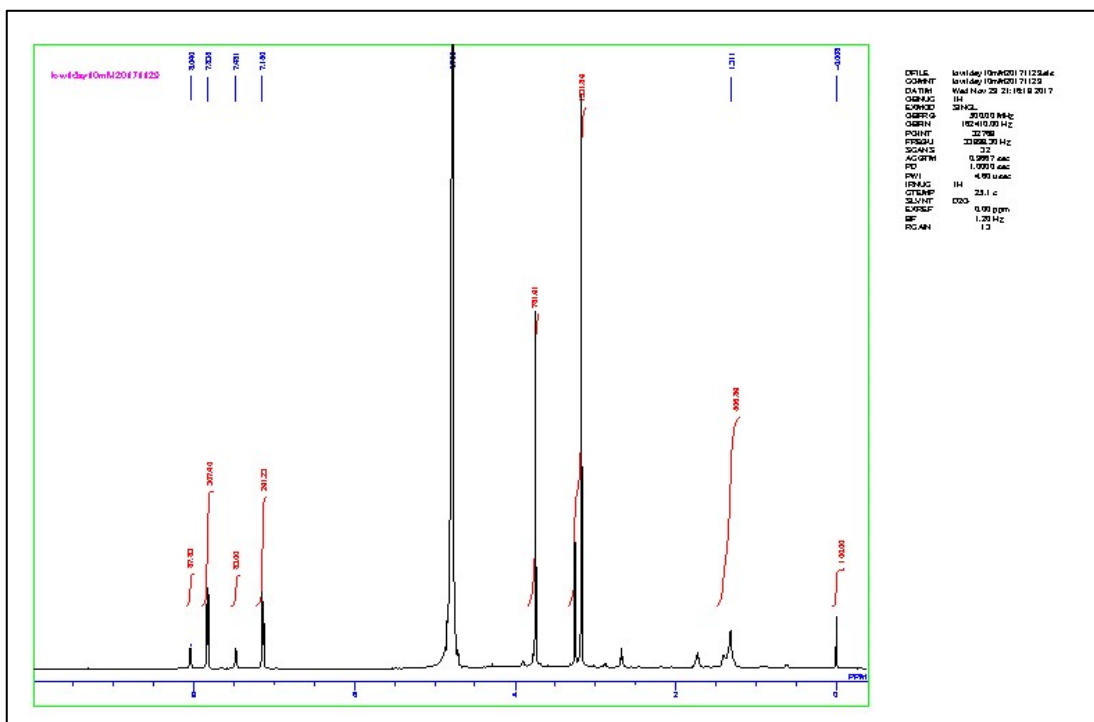
Table.3-7-7 Gel の作製条件

	高濃度 Dode-DSP (High)		低濃度 Dode-DSP (Low)
ElastinA(mg)	24	ElastinA(mg)	24
Fibrillin-X (mg)	24	Fibrillin-X (mg)	24
Dode-DSP (μl) (1000mM)	40.35	Dode-DSP (μl) (345.8mM)	18.67
Milli-Q(μl)	20.13	Milli-Q	41.81
Na ₂ CO ₃ aq(μl) (500mM)	11.52	Na ₂ CO ₃ aq(μl) (500mM)	11.52

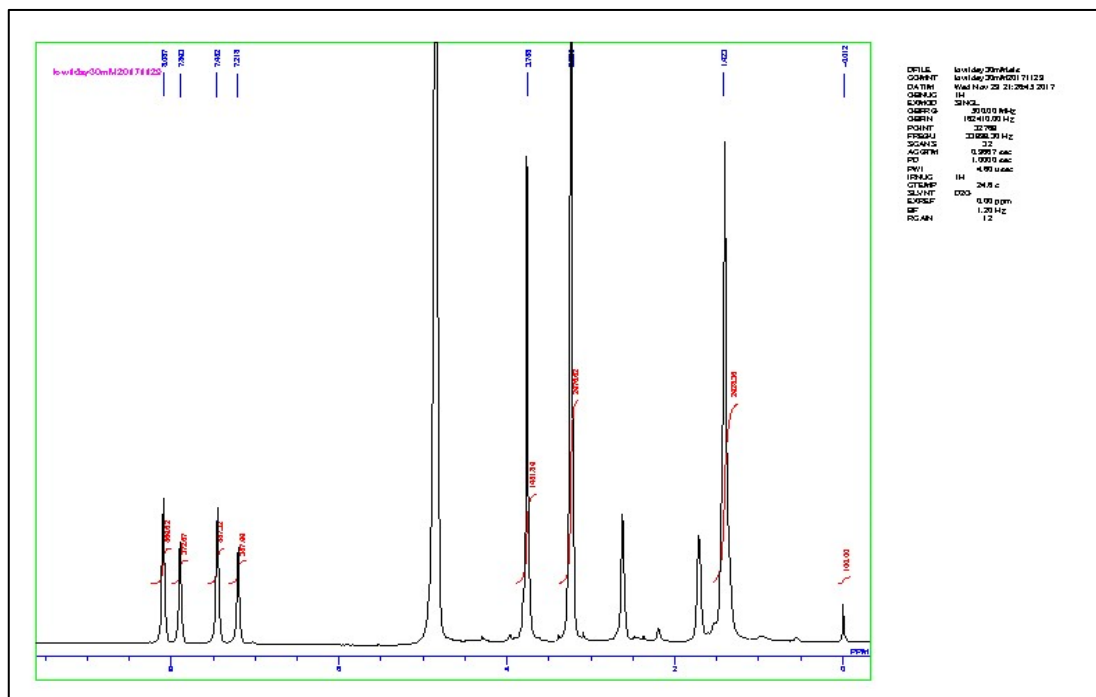
Low 1mM 1day



Low 10mM 1day



Low 30mM 1day



Low 50mM 1day

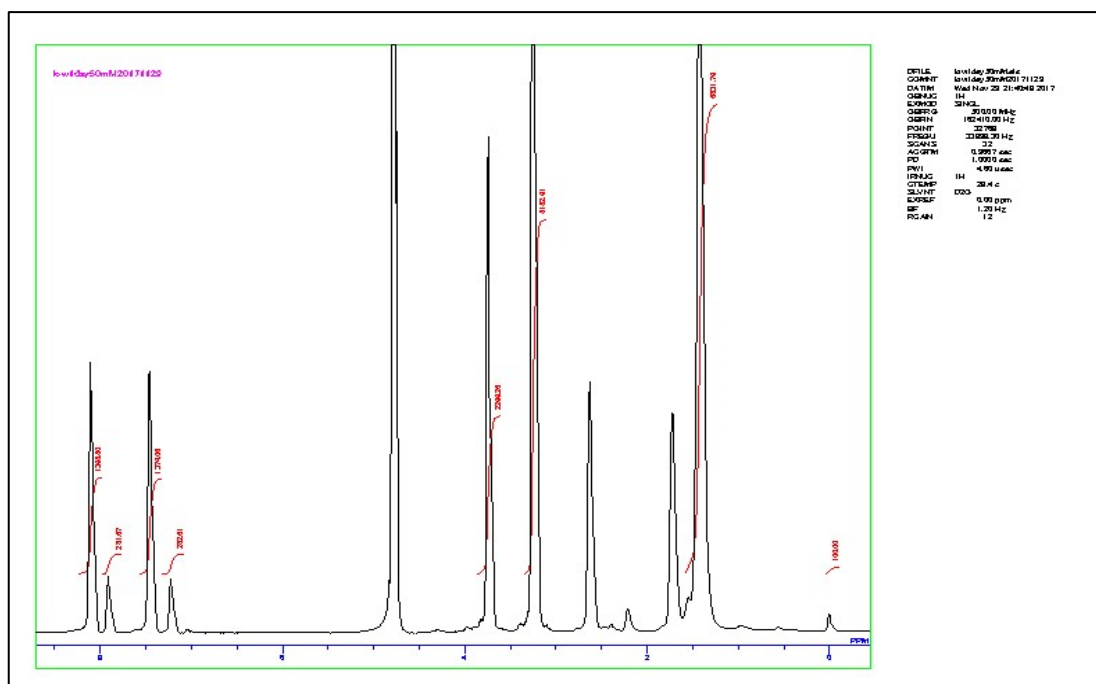
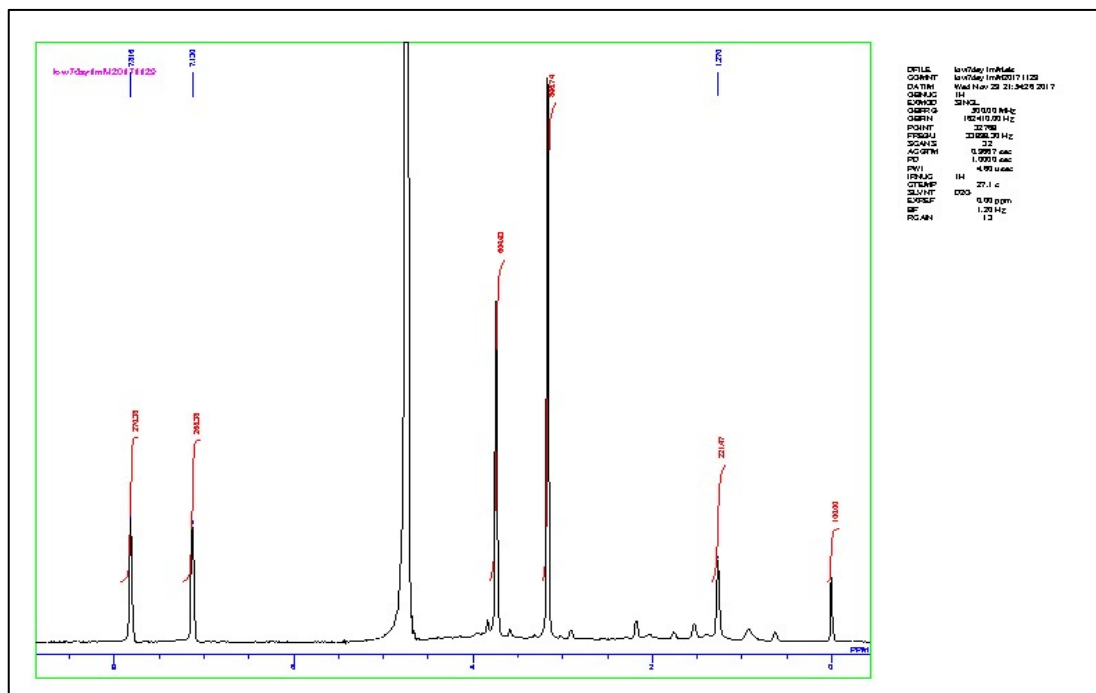


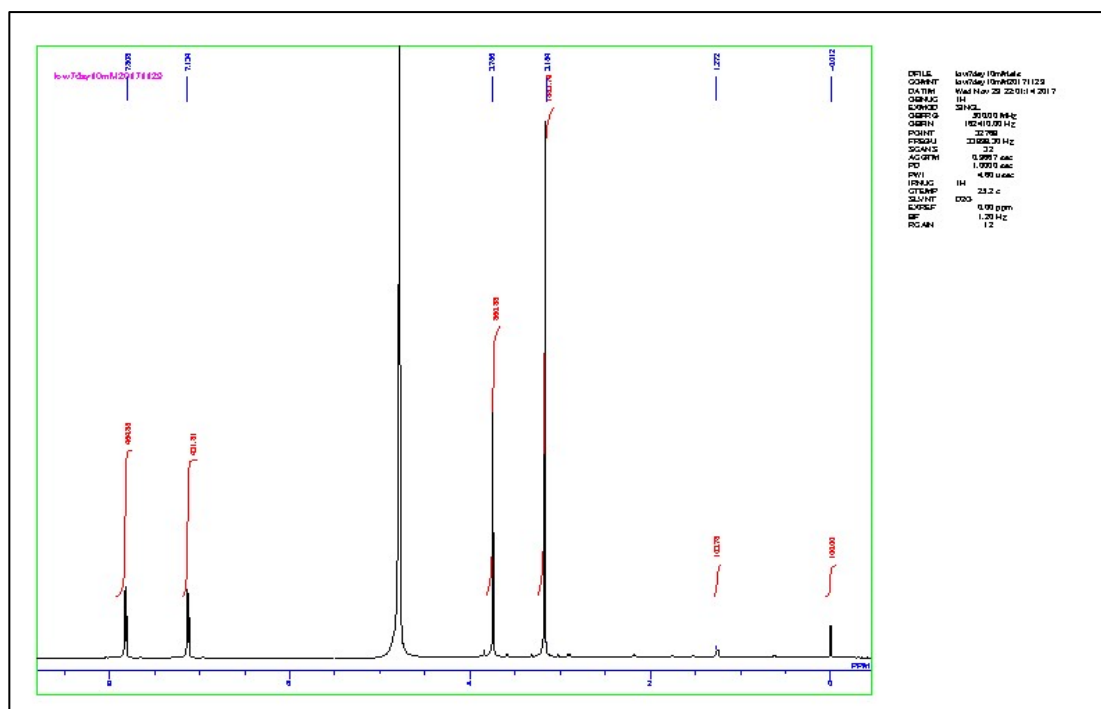
Fig.3-7-8 1日ゲル(Low)を浸した Dode-DSP 水溶液の NMR 測定

高濃度の 30mM、50mM のサンプルは添加した Dode-DSP が 1mM や 10mM と比較すると多く残っていた。(Fig,3-7-8)

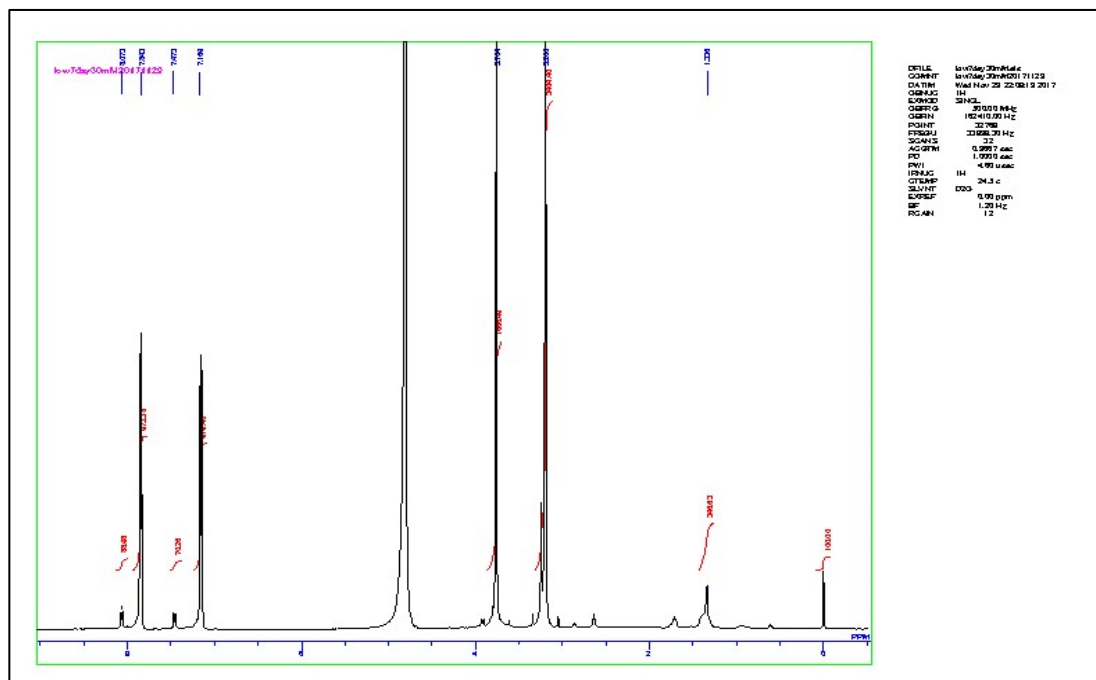
Low 1mM 7day



Low 10mM 7day



Low 30mM 7day



Low 50mM 7day

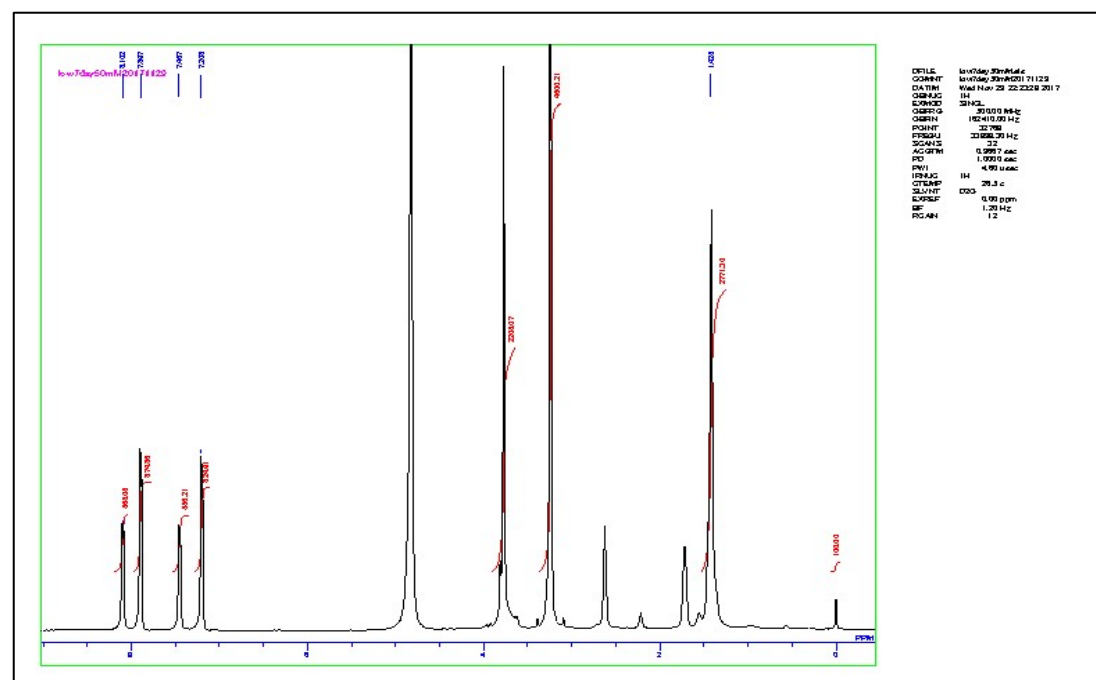
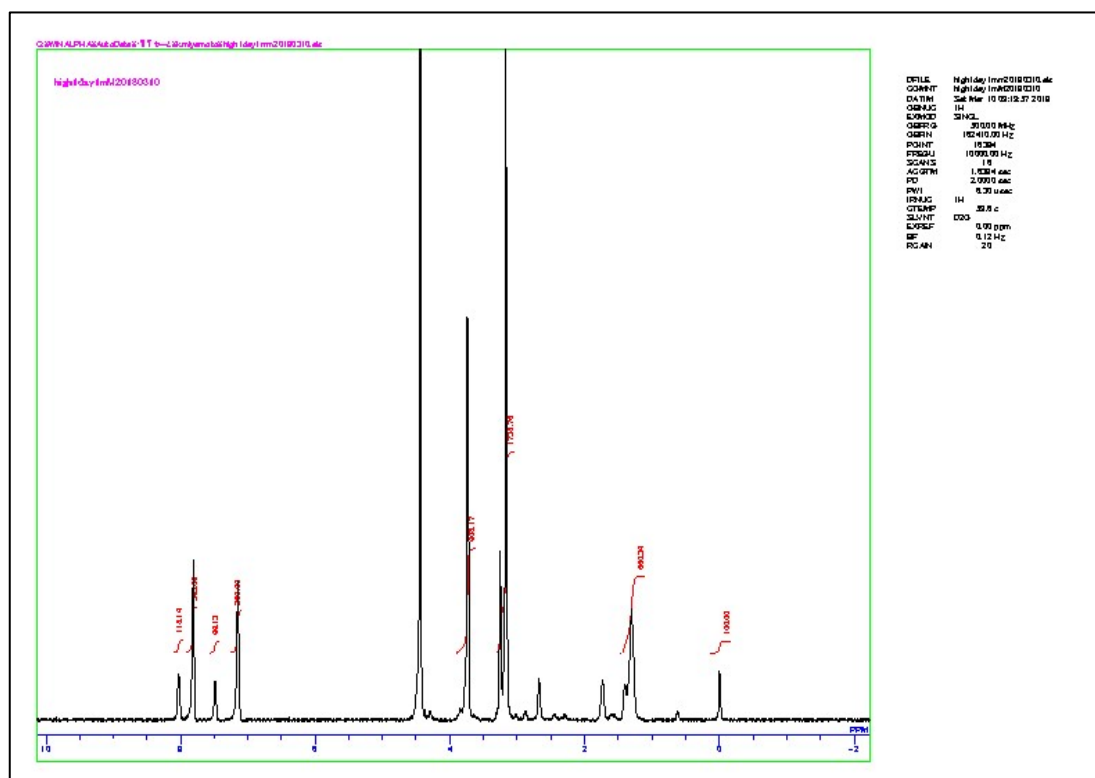


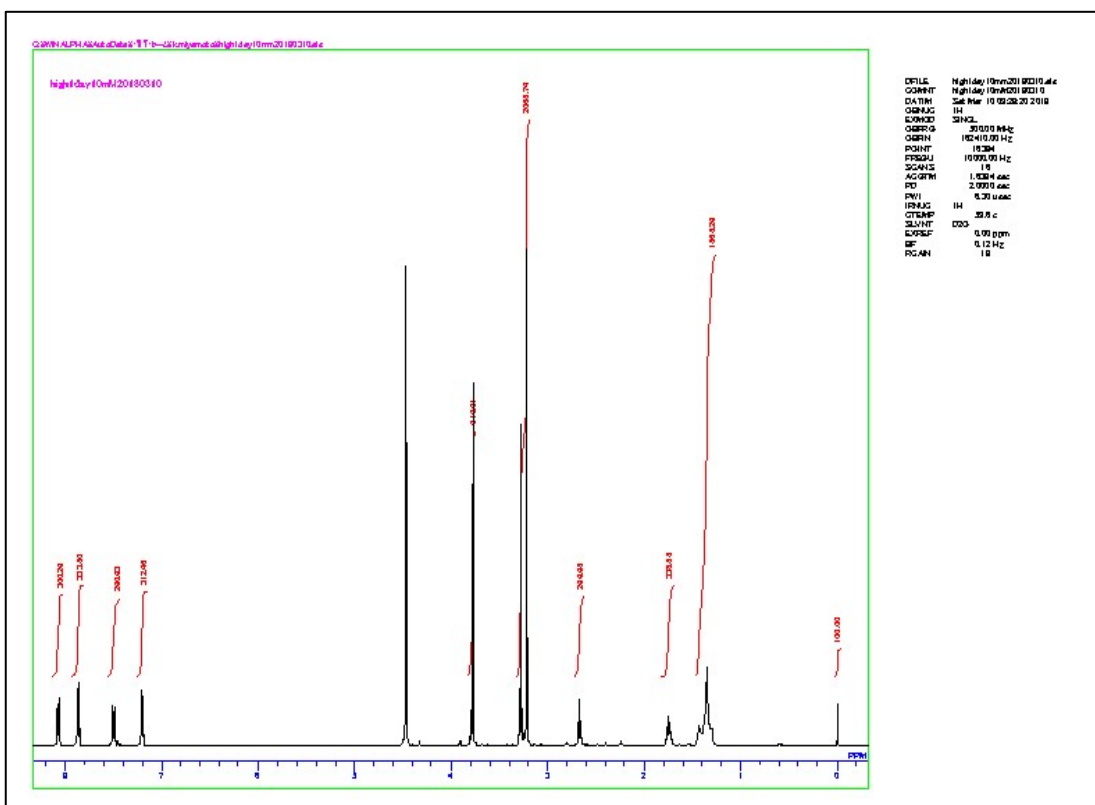
Fig.3-7-9 7日ゲル(Low)を浸した Dode-DSP 水溶液の NMR 測定

1日目と比較すると Dode-DSP の量はどのサンプルも減少していた。(Fig.3-7-)

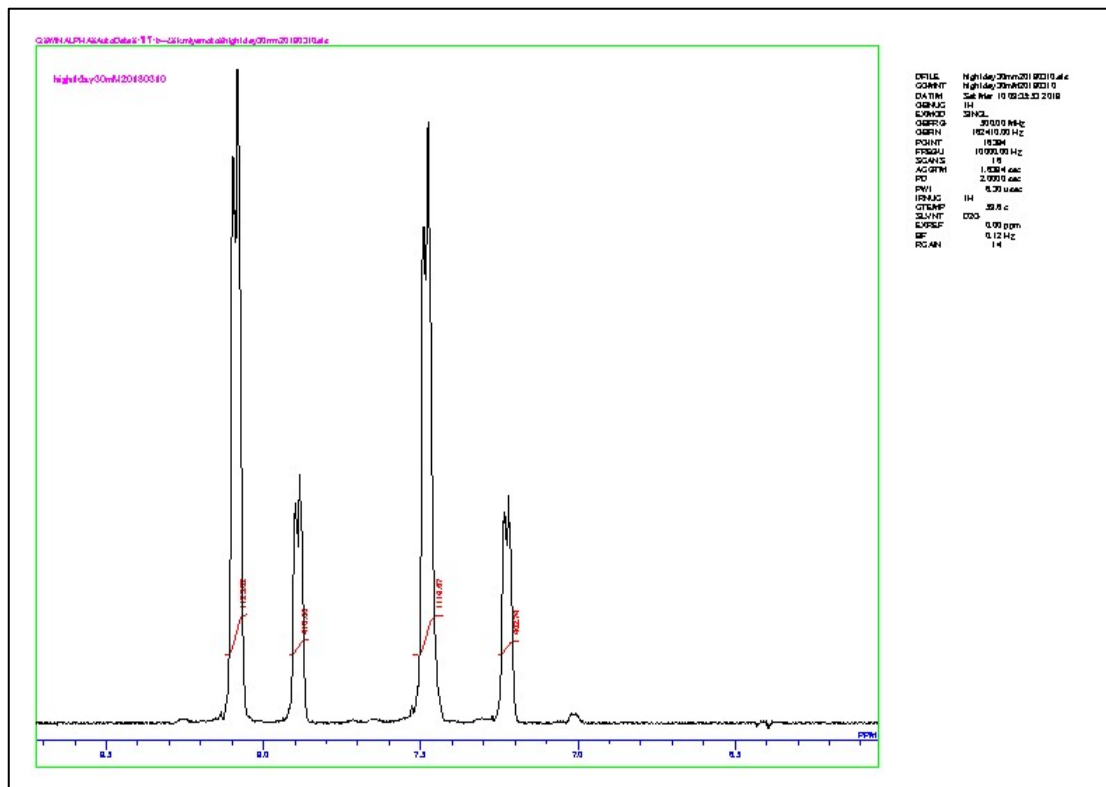
High 1mM 1day



High 10mM 1day



High 30mM 1day



High 50mM 1day

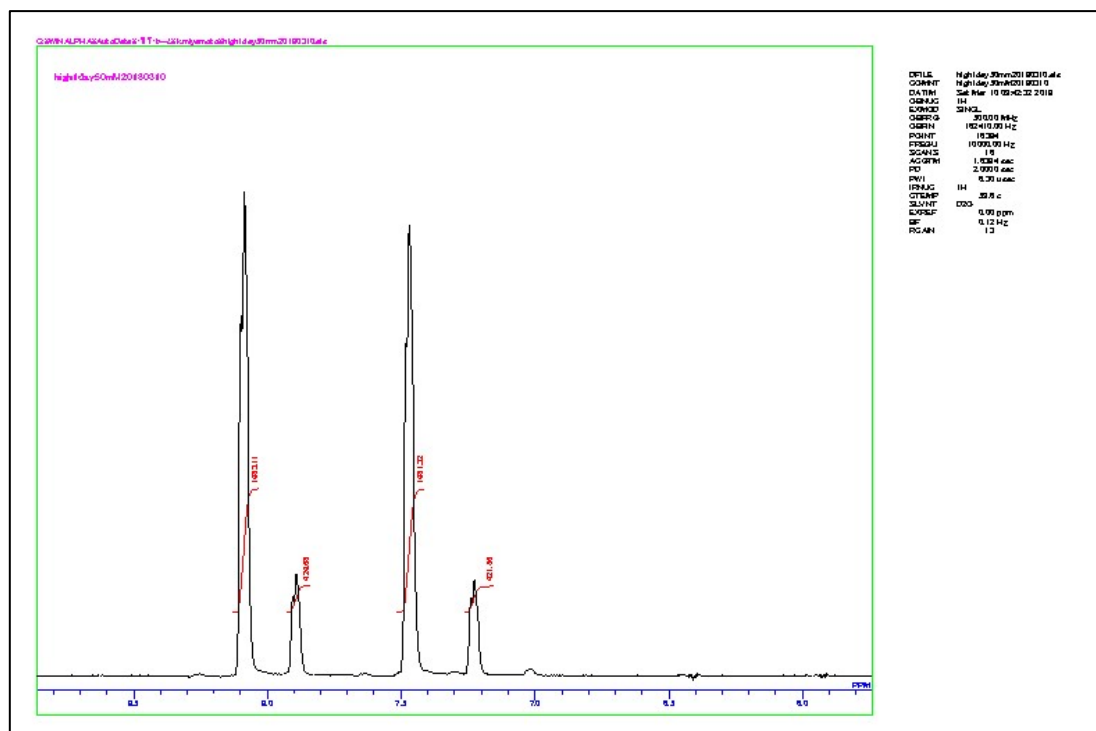
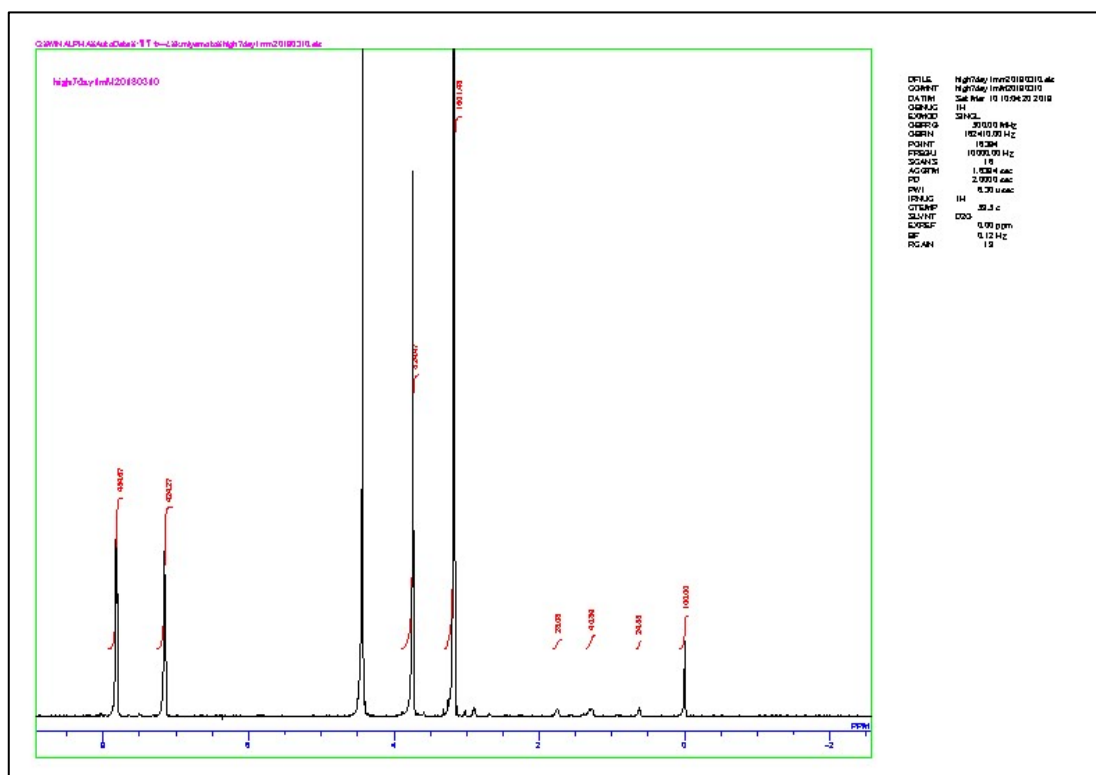
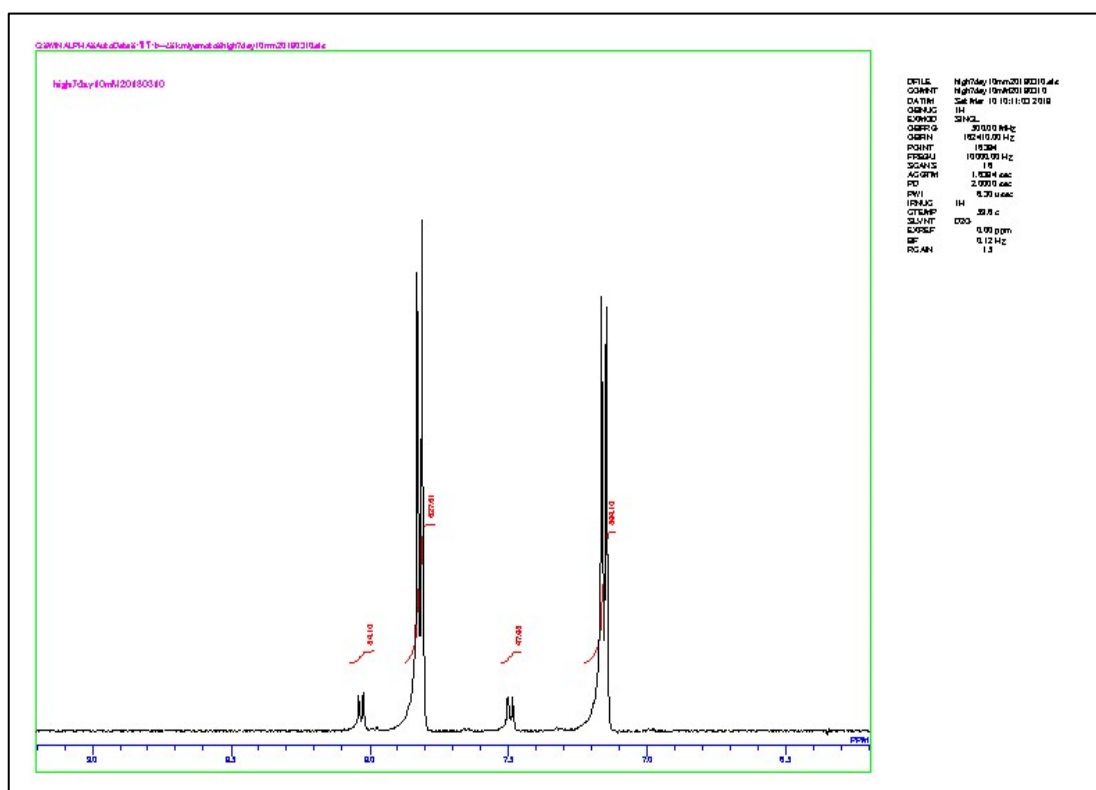


Fig.3-7-10 1日ゲル(High)を浸した Dode-DSP 水溶液の NMR 測定

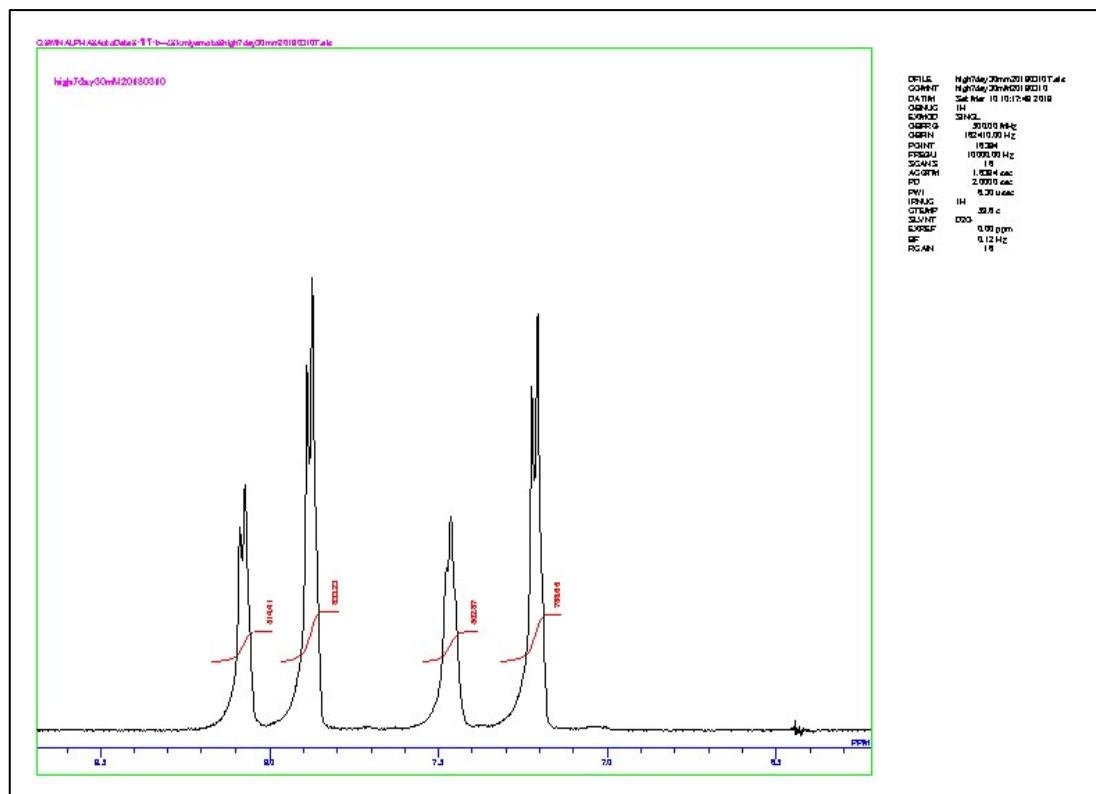
High 1mM 7day



Low 10mM 7day



High 30mM 7day



High 50mM 7day

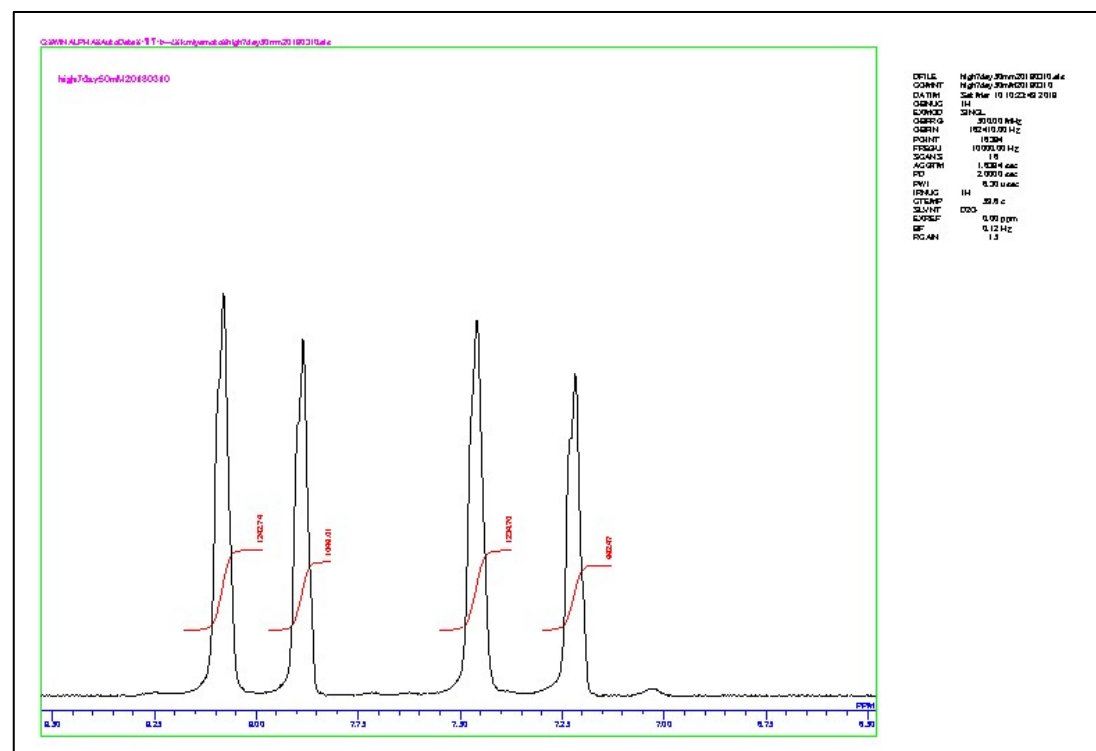


Fig.3-7-11 7日ゲル(High)を浸した Dode-DSP 水溶液の NMR 測定

NMR の測定結果より、TSS を 1 とした際の各サンプルの溶出 DSP のモル比を計算した。(Fig.3-7-12)

Low

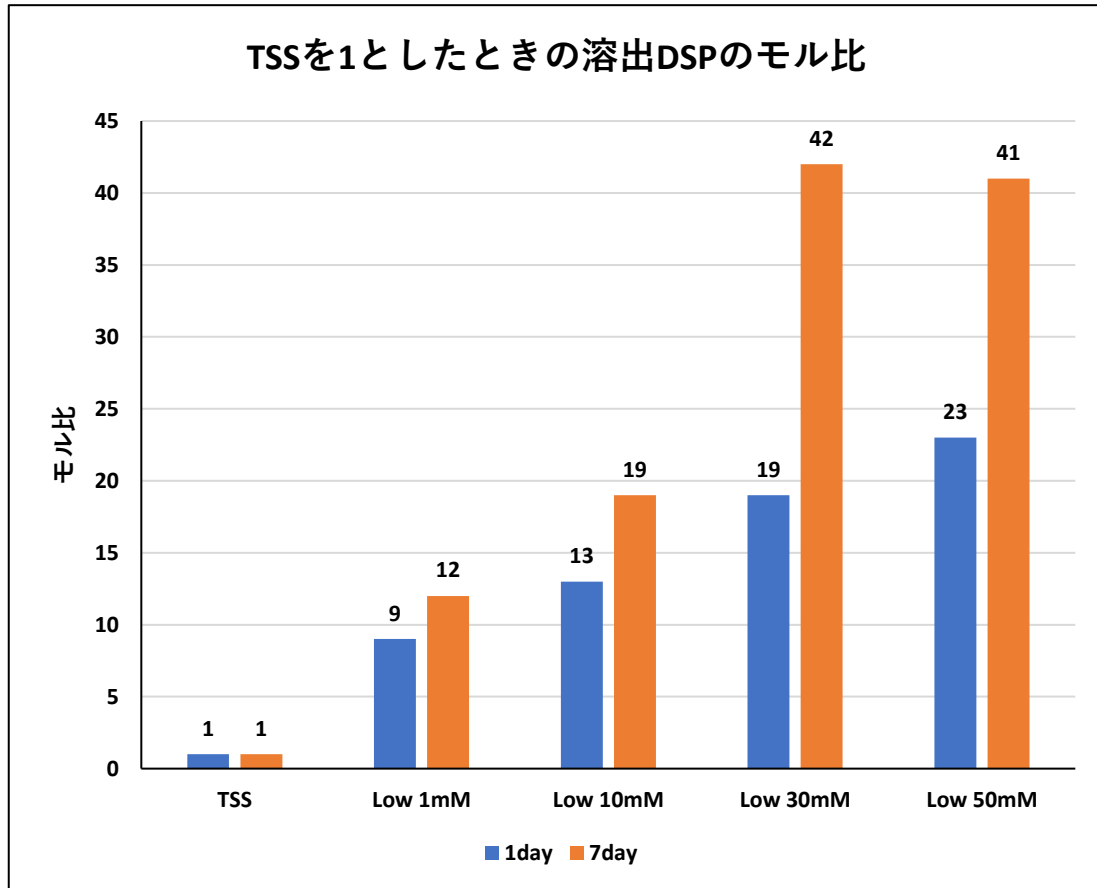


Fig.3-7-12 TSS を 1 としたときの溶出 DSP のモル比 (Low)

1 日目よりも 7 日の方が溶出 DSP 量が多くなっていた。(Fig.3-7-12)

High

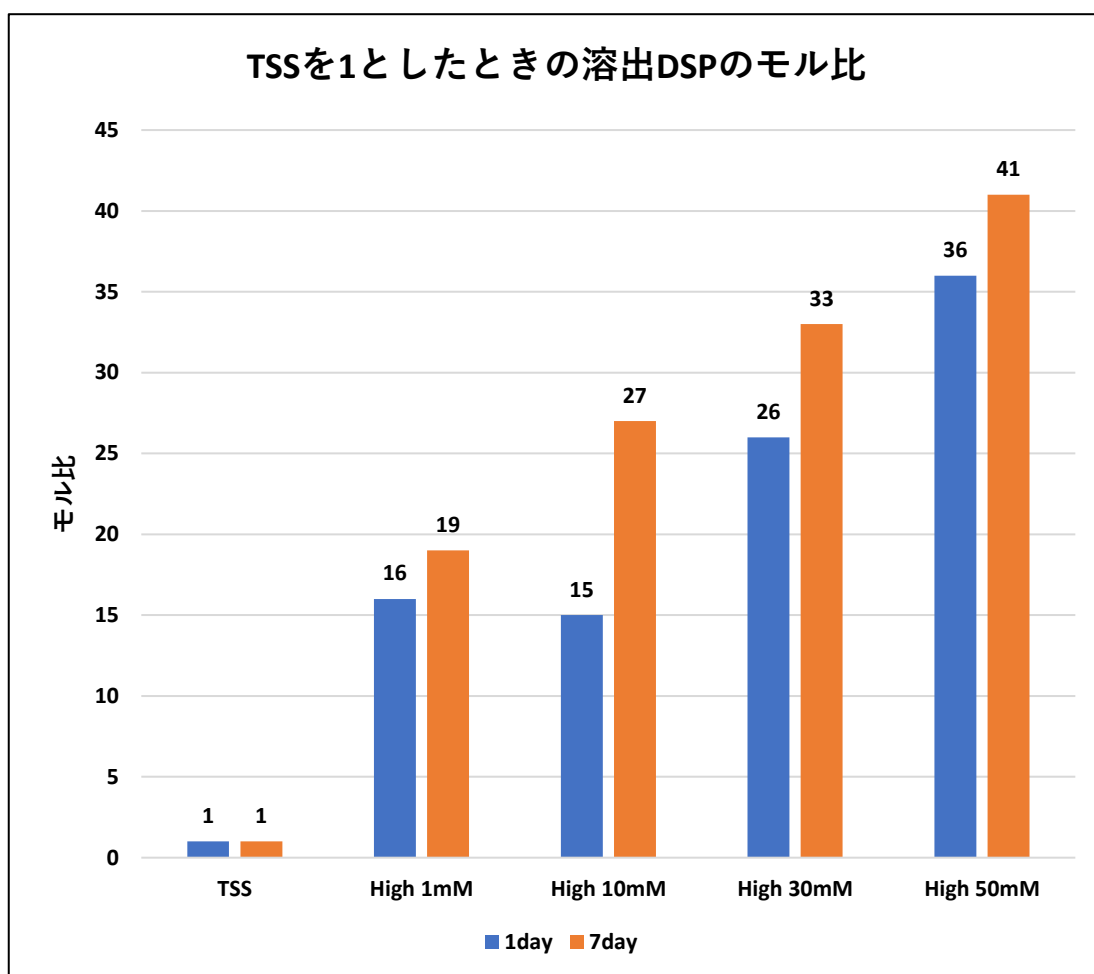


Fig.3-7-13 TSS を 1 としたときの溶出 DSP のモル比 (High)

1 日目よりも 7 日の方が溶出 DSP 量が多くなっていた。(Fig.3-7-13)

3-7-7 Dode-DSP 添加 DMEM による力学的強度変化(後付け架橋)

Fibrillin での架橋倍率 0.2,0.1,0.05,0.01,0.005 倍となるような ElastinA-Fibrillin-X Hybrid Gel を作製した。そのゲルを Dode-DSP 添加培地による後付け架橋が可能かを確認するために 10mM,1mM,0.1mM,0.01mM Dode-DSP 添加 DMEM に浸した。1day 後、弾性率を測定した。ゲルの作製条件は Table.3-7-8 に示した。

Table.3-7-8 Gel の作製条件

架橋倍率	0.2 倍	0.1 倍	0.05 倍	0.01 倍	0.005 倍
ElastinA(mg)	24	24	24	24	24
Fibrillin-X (mg)	24	24	24	24	24
Dode-DSP (μ l) (340.1mM)	23.73 (67.25mM)	11.86 (33.61mM)	5.93 (16.81mM)	1.19 (3.37mM)	0.59 (1.67mM)
Milli-Q(μ l)	36.75	48.62	54.55	59.29	59.89
Na ₂ CO ₃ aq(μ l) (500mM)	11.52	11.52	11.52	11.52	11.52

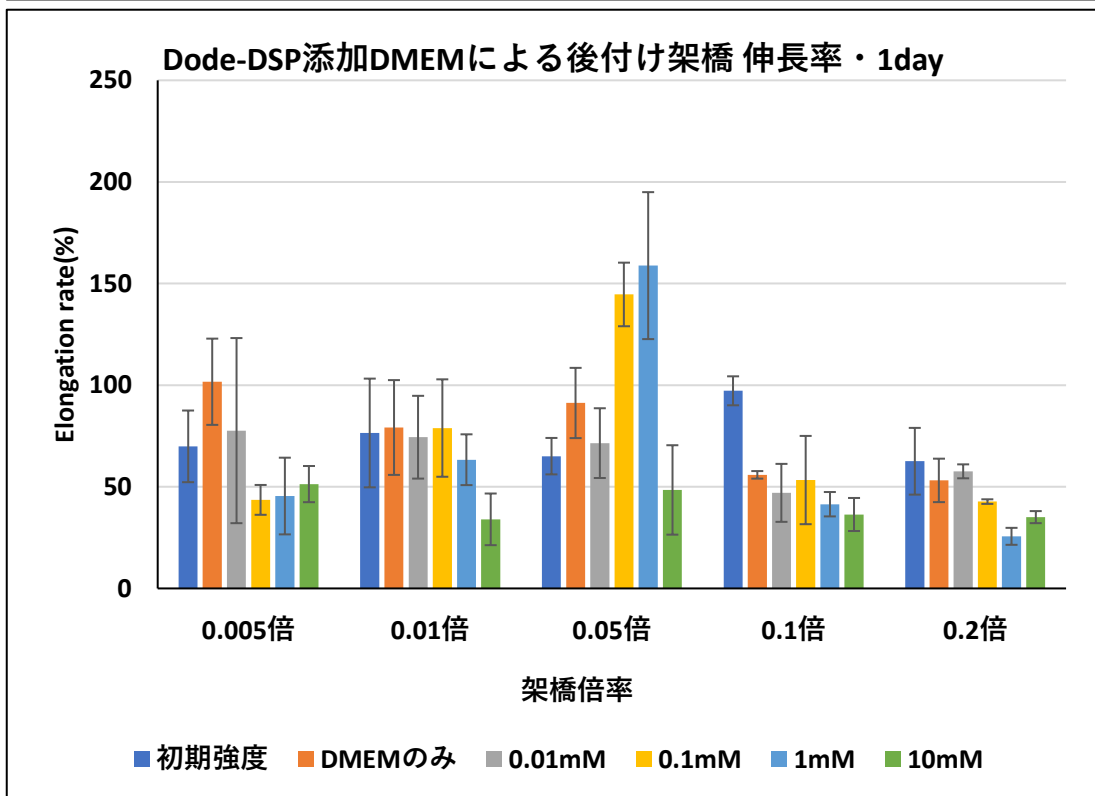
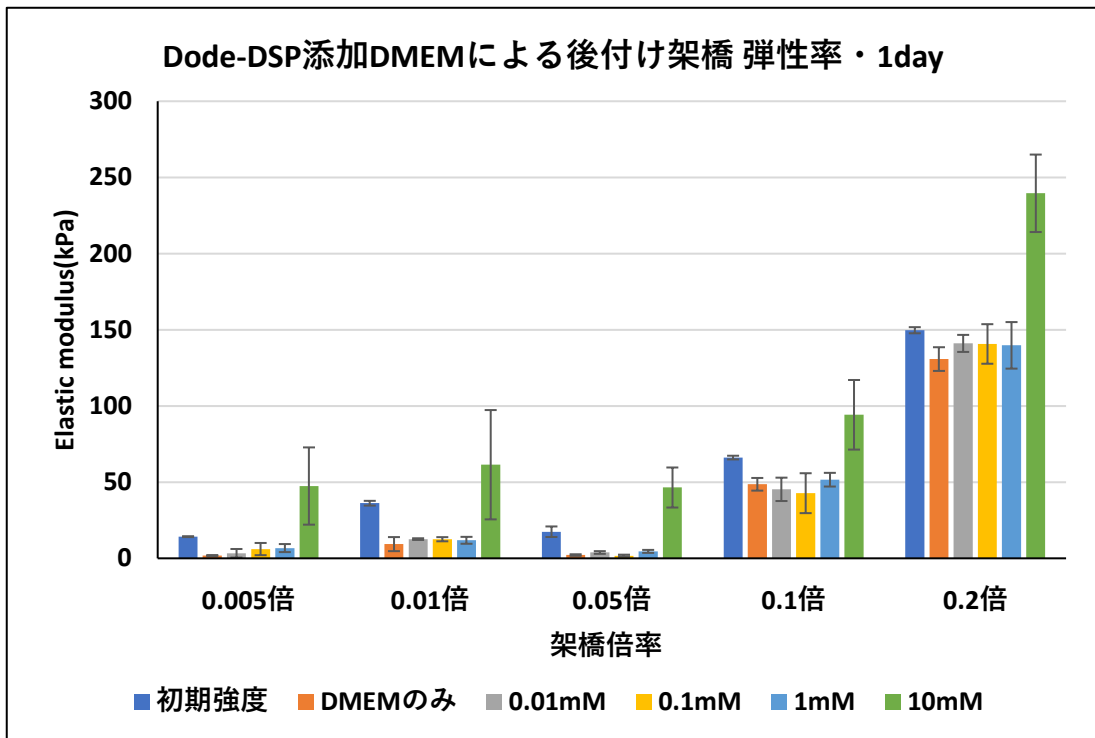


Fig.3-7-14 Dode-DSP 添加 DMEM による力学的強度変化(1day wash)

10mM Dode-DSP 添加 DMEM に浸したものののみ、弾性率が初期強度よりも高くなった。(Fig.3-7-14)

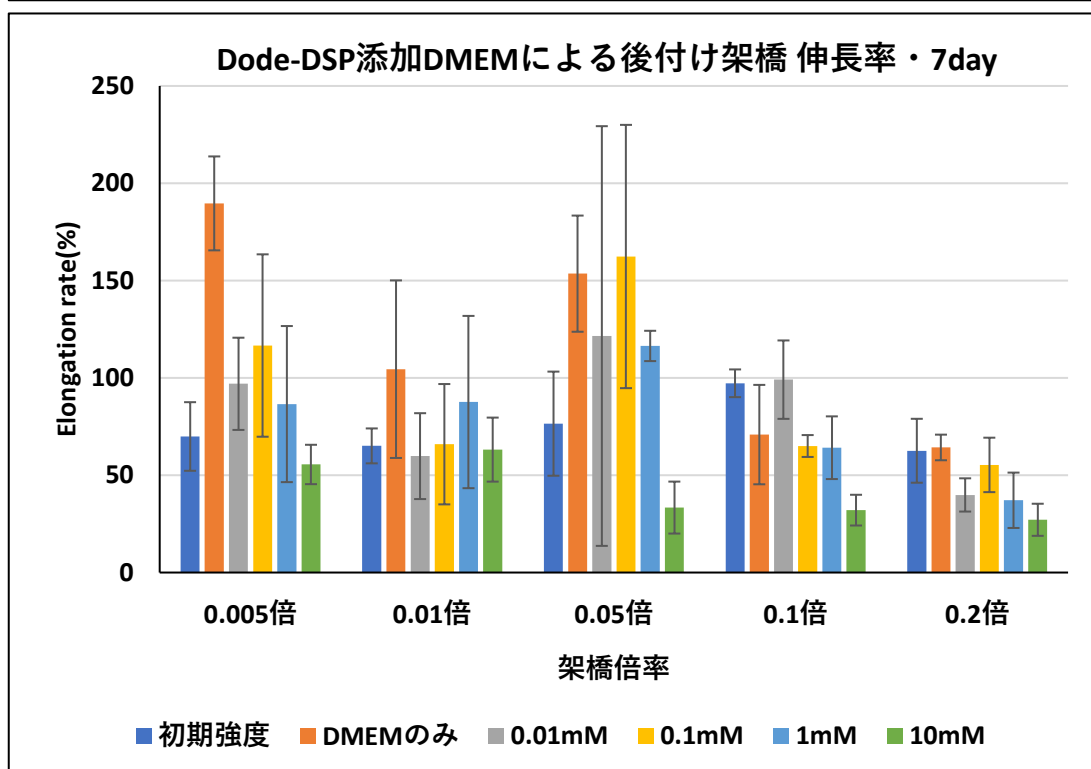
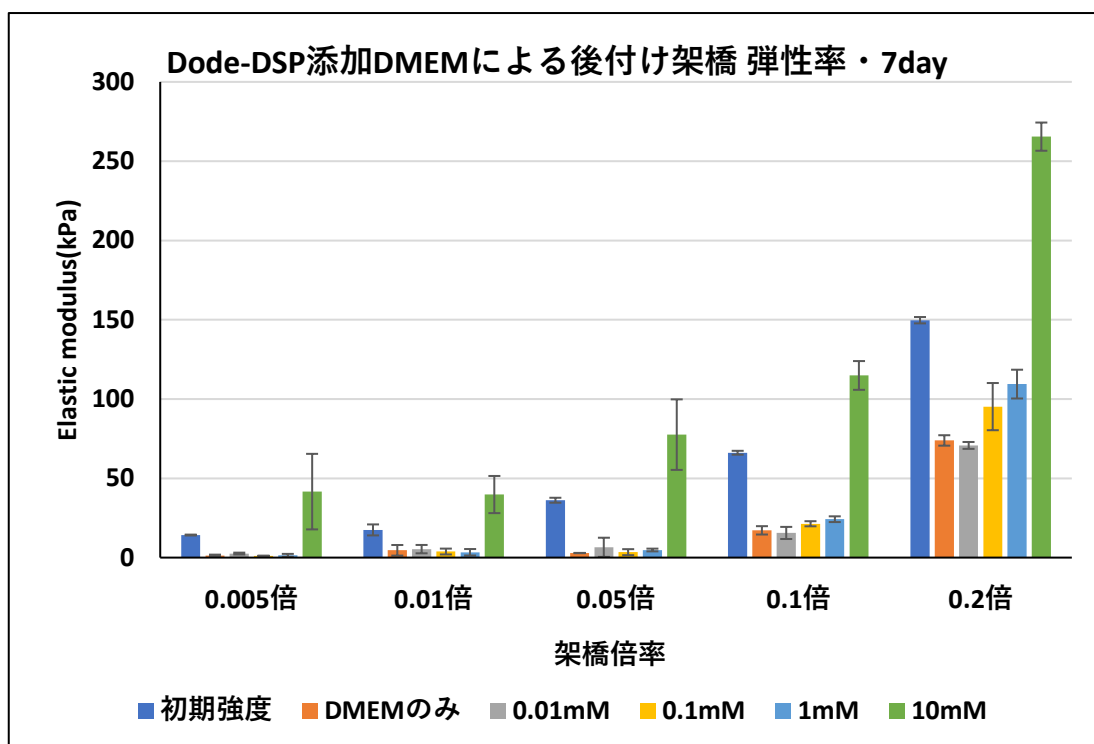


Fig.3-7-15 Dode-DSP 添加 DMEM による力学的強度変化(7day wash)

10mM Dode-DSP 添加 DMEM に浸したもののみ弾性率が初期強度よりも高くなり、その他の濃度では 1day の値よりも低くなっていた。(Fig.3-7-15)

3-8 貫通孔を持つ Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の作製 (AEX Gel)

貫通孔を持ち、力学的強度が高い Gel とするために ElastinA、ElastinE、Fibrillin-X の 3 種類を混合して Hybrid Gel を作製した。弾性率と伸長率が両方とも高くなる混合比率を見つけ出すために以下の比率で Gel を作製した。Gel の作製条件は Table.3-8-1 に示した。

Table.3-8-1 Gel の作製条件

Dode-DSP(1000mM) (μl)	40.35
Milli-Q(μl)	20.13
Na ₂ CO ₃ aq (μl)	11.52

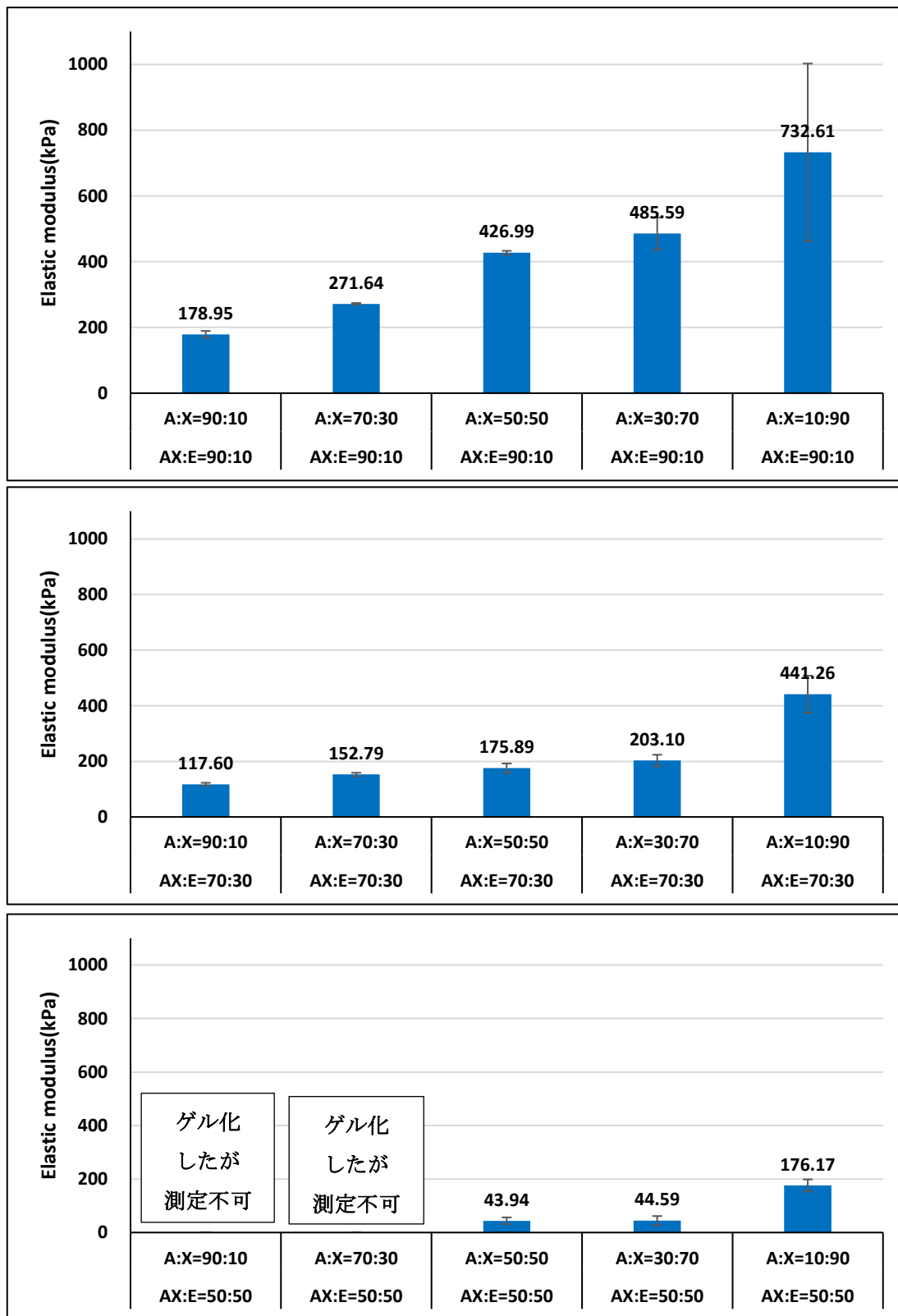
AX:E	90:10	90:10	90:10	90:10	90:10
A:X	90:10	70:30	50:50	30:70	10:90
ElastinA(mg)	38.88	30.24	21.6	12.96	4.32
ElastinE(mg)	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
Fibrillin-X(mg)	4.32	12.96	21.6	30.24	38.88

AX:E	70:30	70:30	70:30	70:30	70:30
A:X	90:10	70:30	50:50	30:70	10:90
ElastinA(mg)	30.24	23.52	16.8	10.08	3.36
ElastinE(mg)	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4
Fibrillin-X(mg)	3.36	10.08	16.8	23.52	30.24

AX:E	50:50	50:50	50:50	50:50	50:50
A:X	90:10	70:30	50:50	30:70	10:90
ElastinA(mg)	21.6	16.8	12	7.2	2.4
ElastinE(mg)	24	24	24	24	24
Fibrillin-X(mg)	2.4	7.2	12	16.8	21.6

AX:E	40:60	30:70	10:90
A:X	50:50	50:50	50:50
ElastinA(mg)	9.6	7.2	7.2
ElastinE(mg)	28.8	33.6	43.2
Fibrillin-X(mg)	9.6	7.2	7.2

3-8-1 力学的強度測定



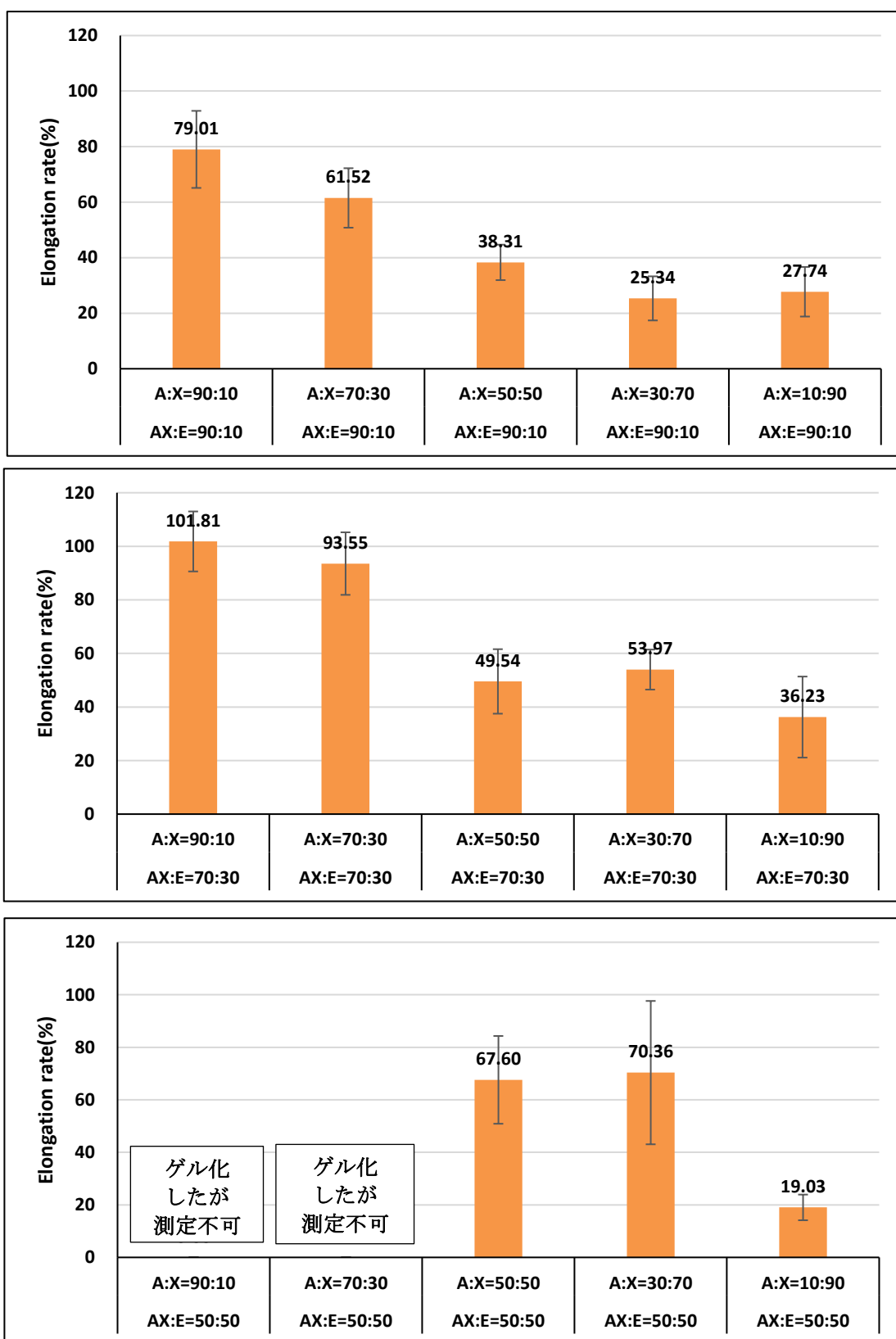


Fig.3-8-1 貫通孔を持つ Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の弾性率・伸長率

AX:E=40:60 (A:X=50:50)はゲル化したが測定不可(Not Measurement: N.M)であり、AX:E=30:70 (A:X=50:50)、AX:E=10:90 (A:X=50:50)はゲル化しなかった。(Not Gelation: N.G) Fig.3-8-1の結果よりElastinEの割合が高くなるほど弾性率は低下し、伸長率は上昇した。ElastinEが30:70以上になるとゲル化しなかった。また、Fibrillin-Xの割合が高くなるほど弾性率は上昇し、伸長率は減少した。この結果より、弾性率と伸長率がともに高いゲルとなる混合比率はAX:E=80:20~60:20、A:X=80:20~50:50であると考え、Table.3-7-10のような作製条件でゲルを作製した。

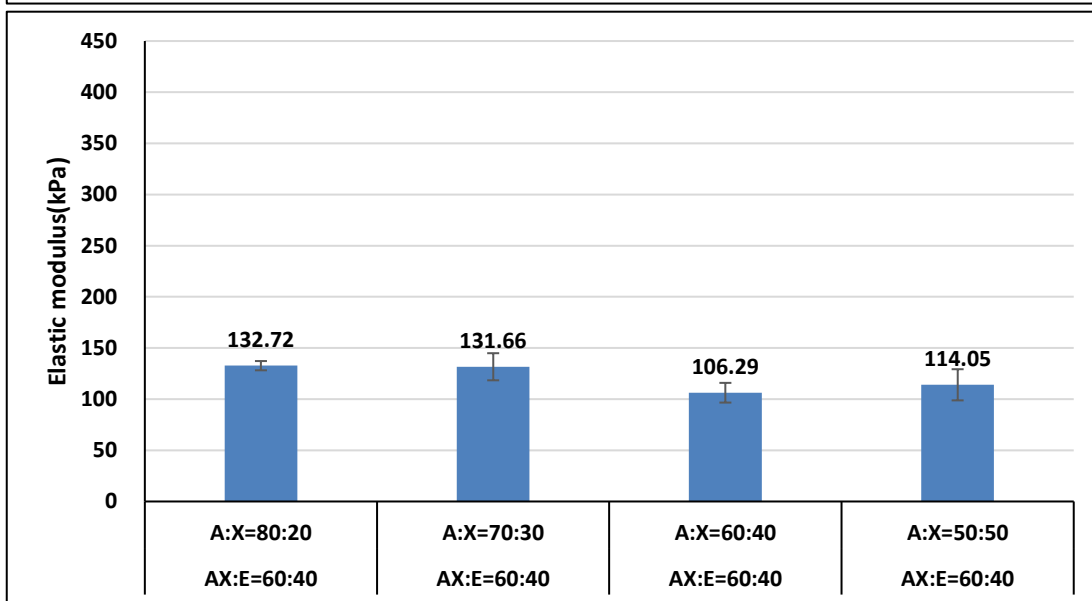
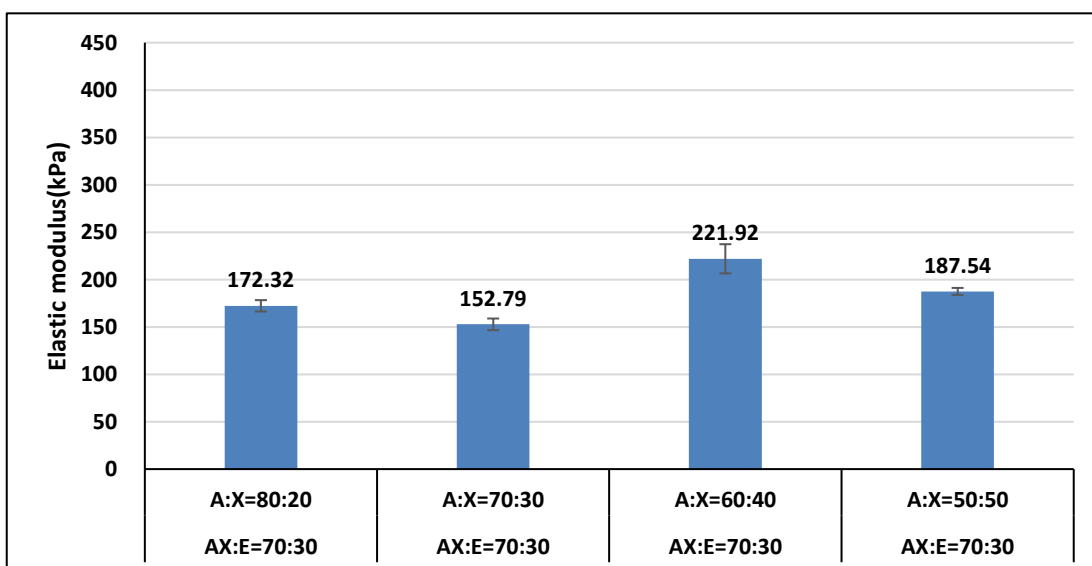
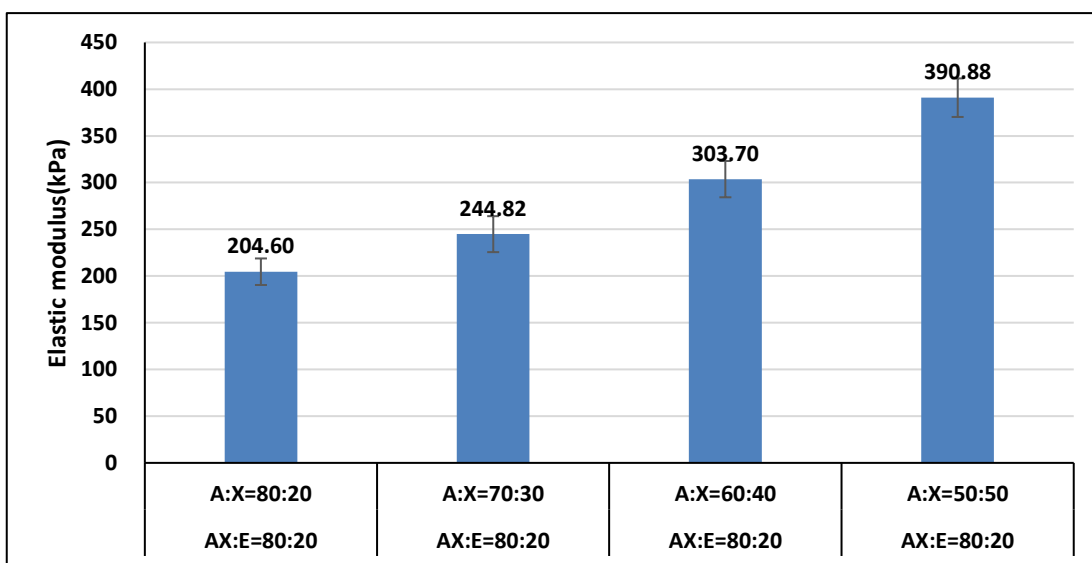
Table.3-8-2 Gelの作製条件

Dode-DSP(1000mM)(μ l)	40.35
Milli-Q(μ l)	20.13
Na ₂ CO ₃ aq(μ l)	11.52

AX:E	80:20	80:20	80:20	80:20
A:X	80:20	70:30	60:40	50:50
ElastinA(mg)	30.72	26.88	23.04	19.2
ElastinE(mg)	9.6	9.6	9.6	9.6
Fibrillin-X(mg)	7.68	11.52	15.36	19.2

AX:E	70:30	70:30	70:30	70:30
A:X	80:20	70:30	60:40	50:50
ElastinA(mg)	26.88	23.52	20	16.8
ElastinE(mg)	14.4	14.4	14.4	14.4
Fibrillin-X(mg)	6.72	10.08	13.6	16.8

AX:E	60:40	60:40	60:40	60:40
A:X	80:20	70:30	60:40	50:50
ElastinA(mg)	23.04	20.16	17.28	14.4
ElastinE(mg)	19.2	19.2	19.2	19.2
Fibrillin-X(mg)	5.76	8.64	11.52	14.4



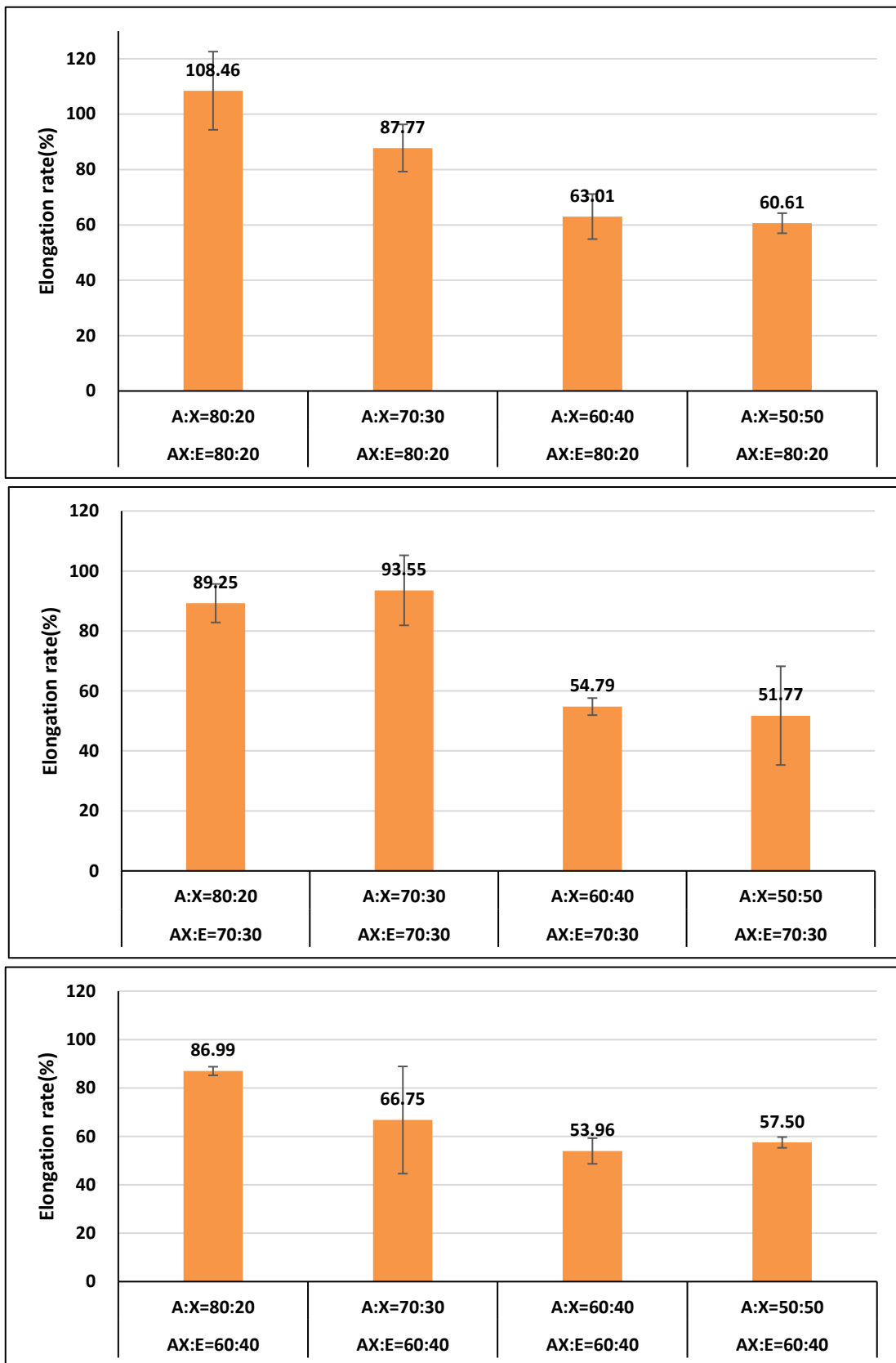


Fig.3-8-2 貫通孔を持つ Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の弾性率・伸長率

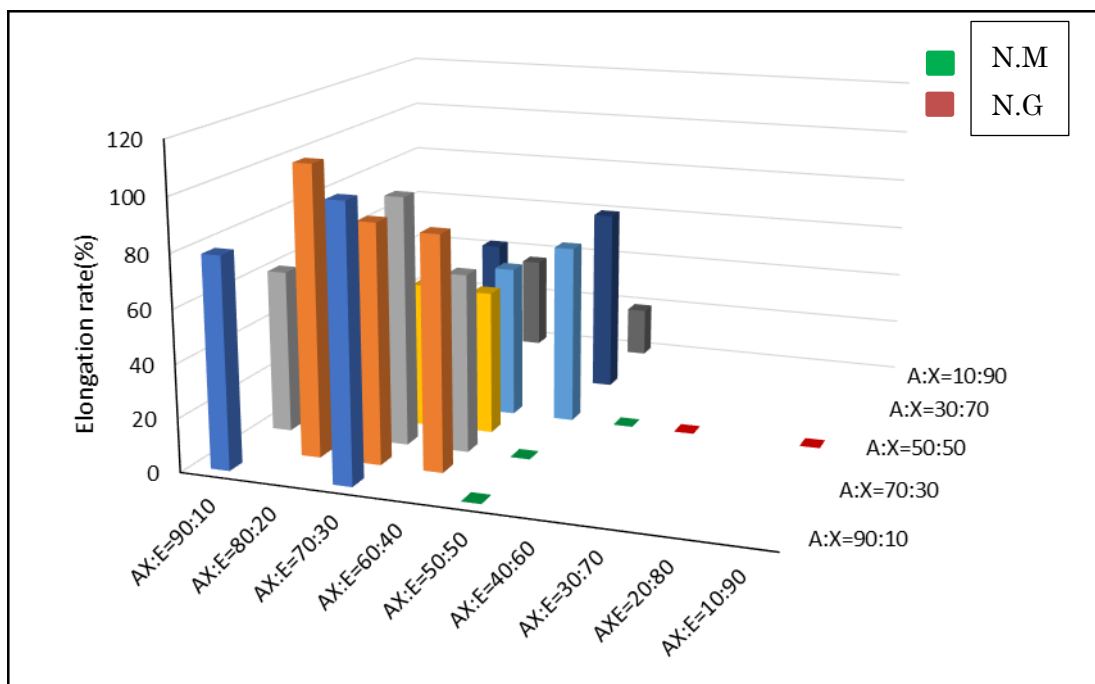
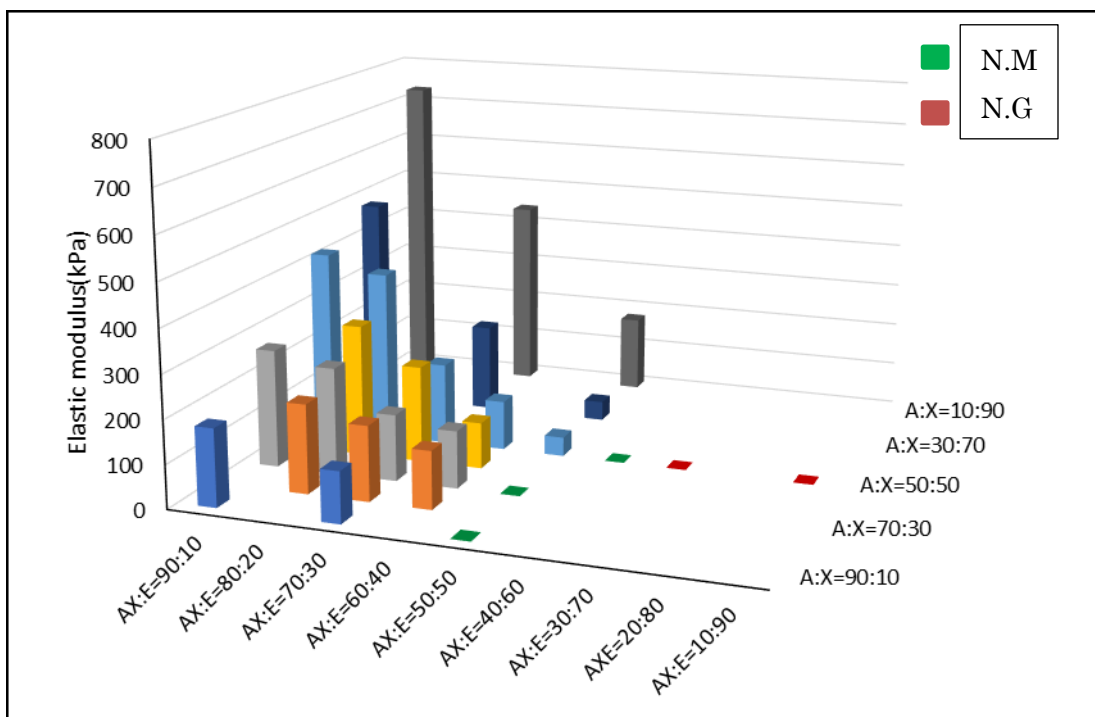


Fig.3-8-3 貫通孔を持つ Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の弾性率・伸長率まとめ

ElastinA、ElastinE、Fibrillin-X の混合比率には傾向が見られた。また、AX:E=70:30、A:X=80:20 の Hybrid Gel は弾性率と伸長率がともに高い値であり、ElastinE の割合が 30%であるため、比較的大きな孔を形成できると考えた。よって、この混合比率が弾性率・伸長率・貫通孔を保てる最適な混合比率であるとした。

3-8-2 Dode-DSP 洗浄による AEX Gel の力学的強度の変化(後付け架橋)

低濃度の Dode-DSP を 添加した ElastinA+ElastinE+Fibrillin-X Hybrid Gel を作製し、10mM Dode-DSP 水溶液に 1day と 14day 浸し、後付け架橋の効果を測定した。ゲルの作製条件は Table.3-8-3 に示した。

Table.3-8-3 Gel の作製条件

Dode-DSP(340.1mM)(μ l)	18.98
Milli-Q(μ l)	41.50
Na ₂ CO ₃ aq(μ l)	11.52

AX:E	80:20	80:20	80:20
A:X	90:10	80:20	70:30
ElastinA(mg)	34.56	30.72	26.88
ElastinE(mg)	9.6	9.6	9.6
Fibrillin-X(mg)	3.84	7.68	11.52

AX:E	70:30	70:30	70:30
A:X	80:20	70:30	60:40
ElastinA(mg)	30.24	26.88	23.52
ElastinE(mg)	14.4	14.4	14.4
Fibrillin-X(mg)	3.36	6.72	10.08

AX:E	60:40	60:40	60:40
A:X	80:20	70:30	60:40
ElastinA(mg)	25.92	23.04	20.16
ElastinE(mg)	19.2	19.2	19.2
Fibrillin-X(mg)	2.88	5.76	8.64

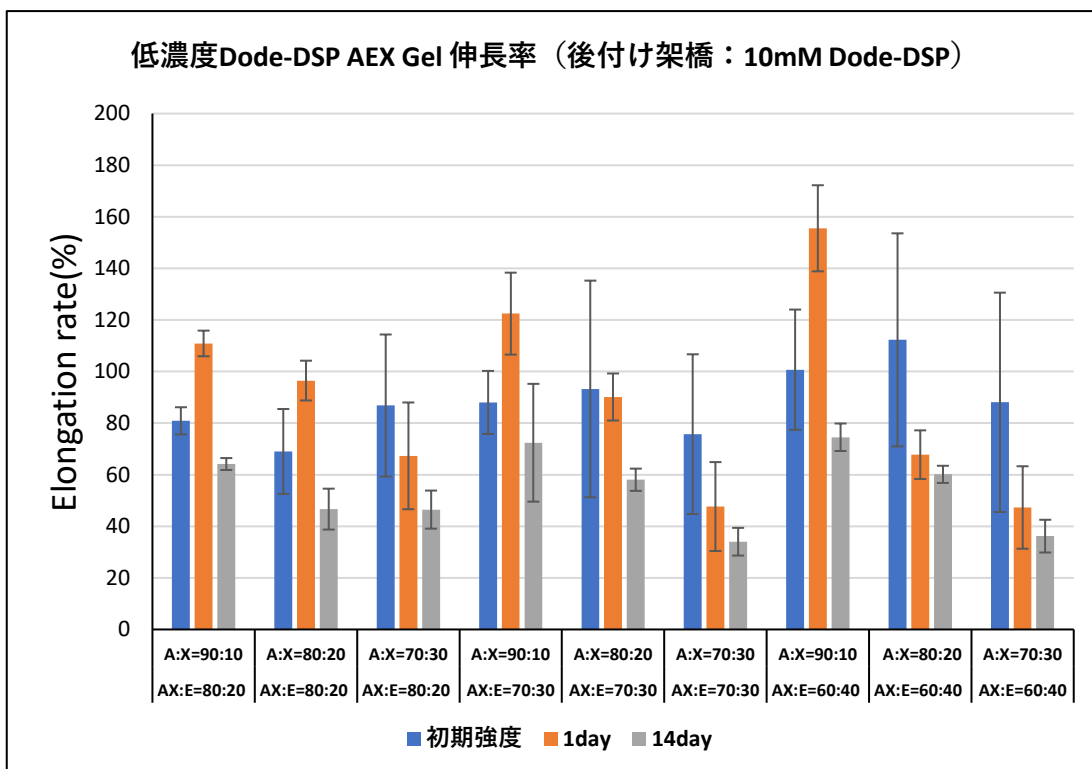
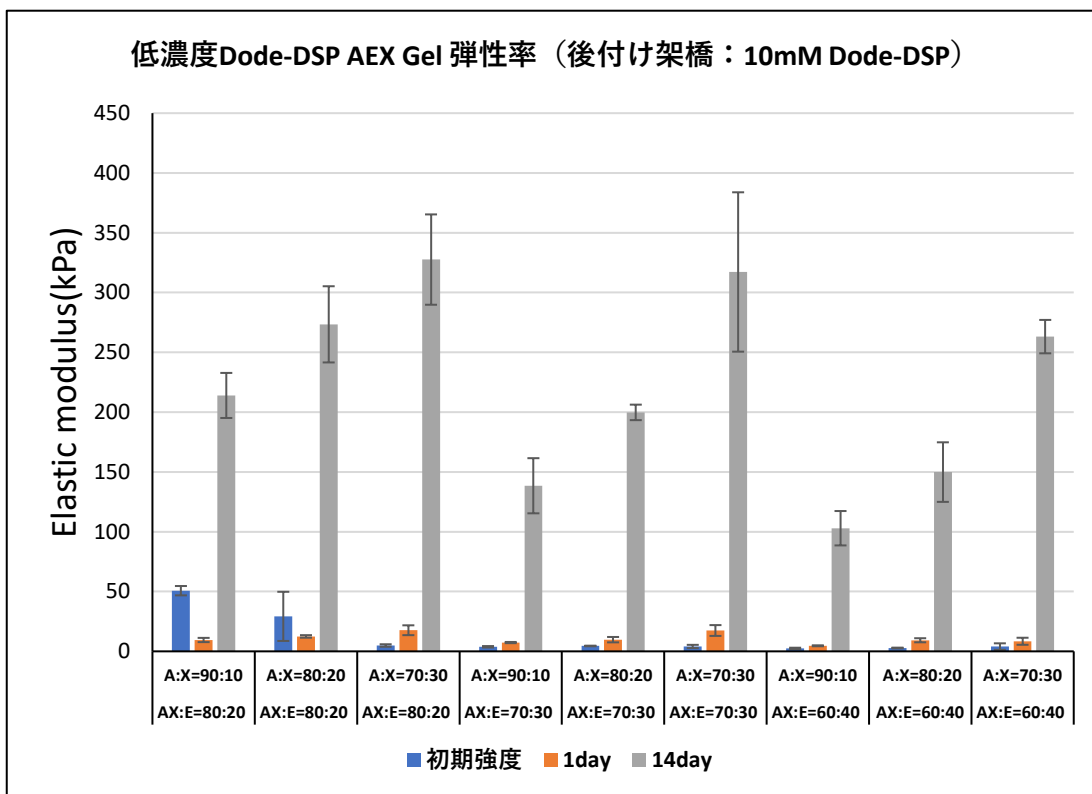


Fig.3-8-4 Dode-DSP 洗浄による低濃度 Dode-DSP AEX Gel の力学的強度の変化

AEX Gel においても後付け架橋は起こった。(Fig.3-8-4)

3-8-3 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による構造観察

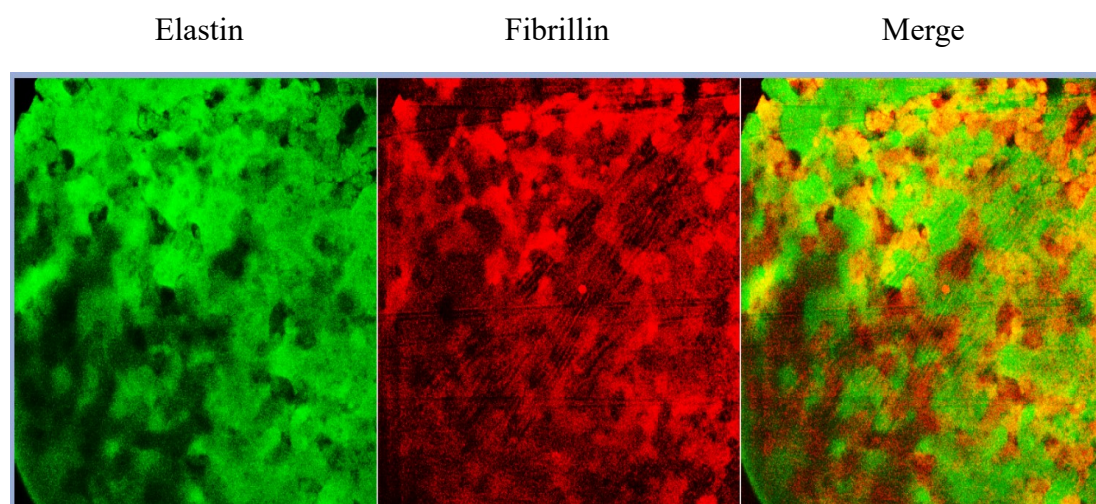
Elastin-Fibrillin Hybrid Gel がどのような構造をしているのか確認するために共焦点レーザー顕微鏡で 3D 画像を撮影した。撮影時には抗体や蛍光色素は用いず、Elastin と Fibrillin の自家蛍光を利用し撮影した。Elastin は Argon488 のレーザー (励起波長 488nm)、Fibrillin は Diode405 のレーザー (励起波長 405nm) を使用した。ゲルの作製条件は Table.3-8-4 に示した。

Table.3-8-4 Gel の作製条件

	ElaA+FibX (AX Gel)	ElaE+FibX (EX Gel)
ElastinA(mg)	24	0
ElastinE(mg)	0	24
Fibrillin-X(mg)	24	24
Milli-Q(μl)	40.00	40.00
Dode-DSP (315.3mM)(μl)	20.48	20.48
Na ₂ CO ₃ aq (500mM)(μl)	11.52	11.52
Range	128.98	112.58
Slices	150	200
Interval	0.87	0.57

ElastinA-Fibrillin-X Hybrid Gel (AX Gel)

2D image



3D image

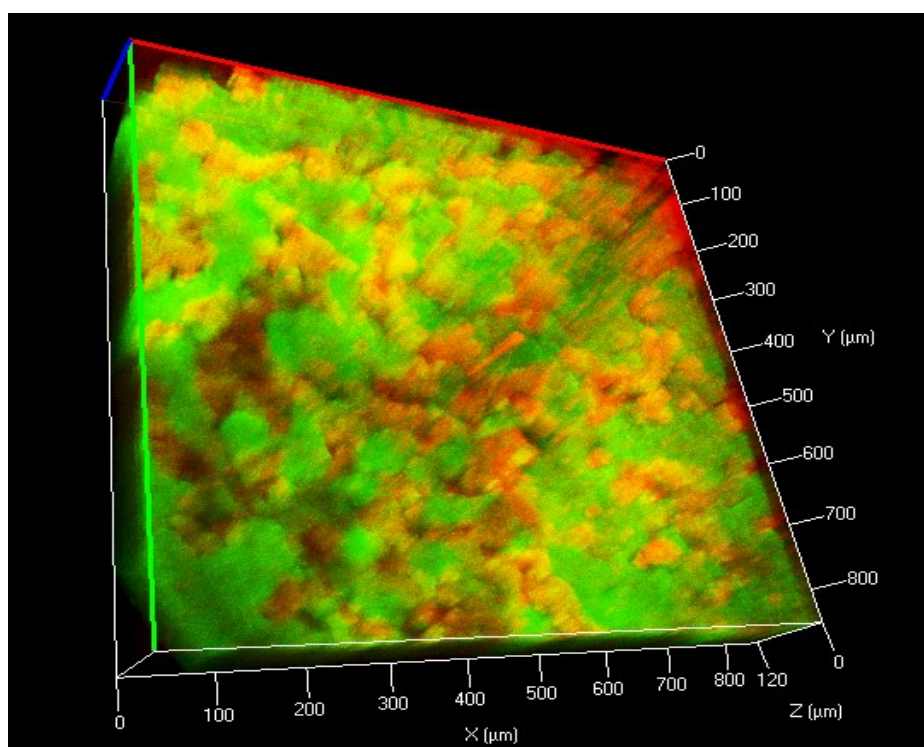
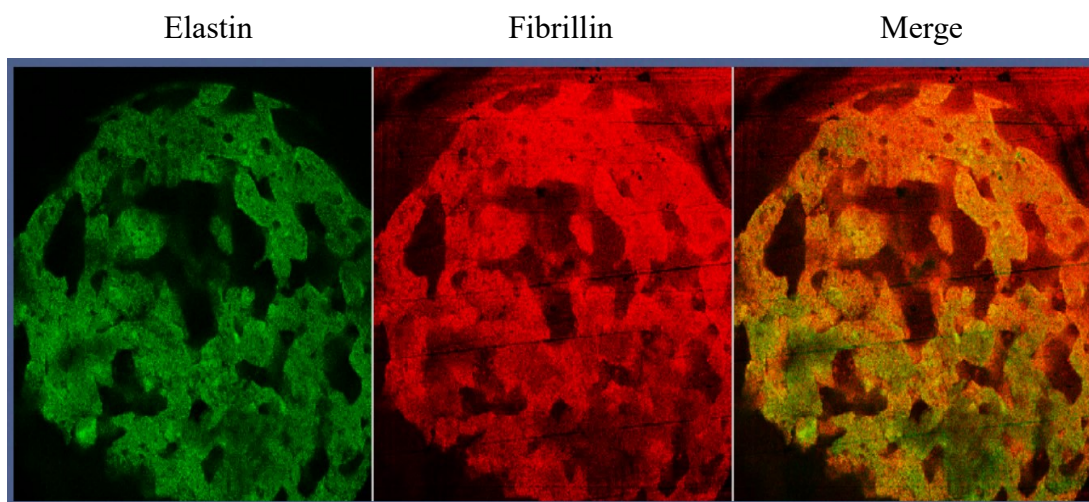


Fig.3-8-5 ElastinA-Fibrillin-X Hybrid Gel の 2 次元・3 次元画像

AX Gel において 2 つのレーザーで撮影した画像は異なる部分が蛍光しており、Elastin と Fibrillin は局在していた。(Fig.3-8-5)

ElastinE-Fibrillin-X Hybrid Gel (EX Gel)

2D image



3D image

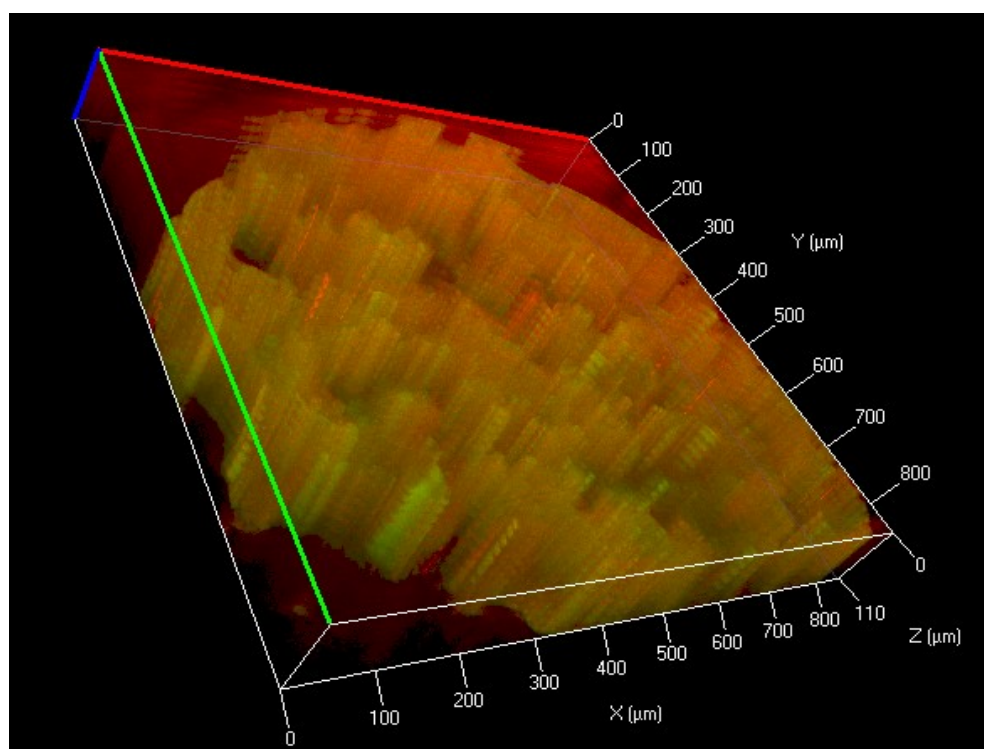


Fig.3-8-6 ElastinE-Fibrillin-X Hybrid Gel の2次元・3次元画像

EX Gel において2つのレーザーで撮影した画像は同じ部分が蛍光しており、ElastinとFibrillinは共局在していた。また、貫通孔が形成されていた。(Fig.3-8-6)

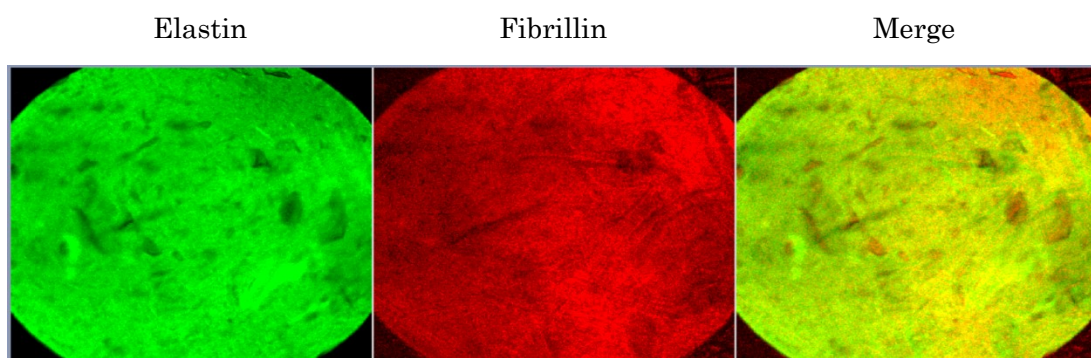
ElastinA+ElastinE+Fibrillin-X Hybrid Gel (AEX Gel) がどのような構造をしているのか確認するために共焦点レーザー顕微鏡で 3D 画像を撮影した。撮影時には抗体や蛍光色素は用いず、Elastin と Fibrillin の自家蛍光を利用し撮影した。Elastin は Argon488 のレーザー(励起波長 488nm)、Fibrillin は Diode405 のレーザー(励起波長 405nm)を使用した。ゲルの作製条件は Table.3-8-5 に示した。

Table.3-8-5 Gel の作製条件

	AX:E=90:10 A:X=80:20	AX:E=70:30 A:X=80:20	AX:E=50:50 A:X=80:20
ElastinA(mg)	34.56	26.88	19.2
ElastinE(mg)	4.8	14.4	24
Fibrillin-X(mg)	8.64	6.72	4.8
Milli-Q(μ l)	20.13	20.13	20.13
Dode-DSP (1000mM)(μ l)	40.35	40.35	40.35
Na ₂ CO ₃ aq (500mM)(μ l)	11.52	11.52	11.52
Range	185.14	131.00	148.53
Slices	400	300	340
Interval	0.46	0.44	0.44

AX:E=90:10 A:X=80:20

2D image



3D image

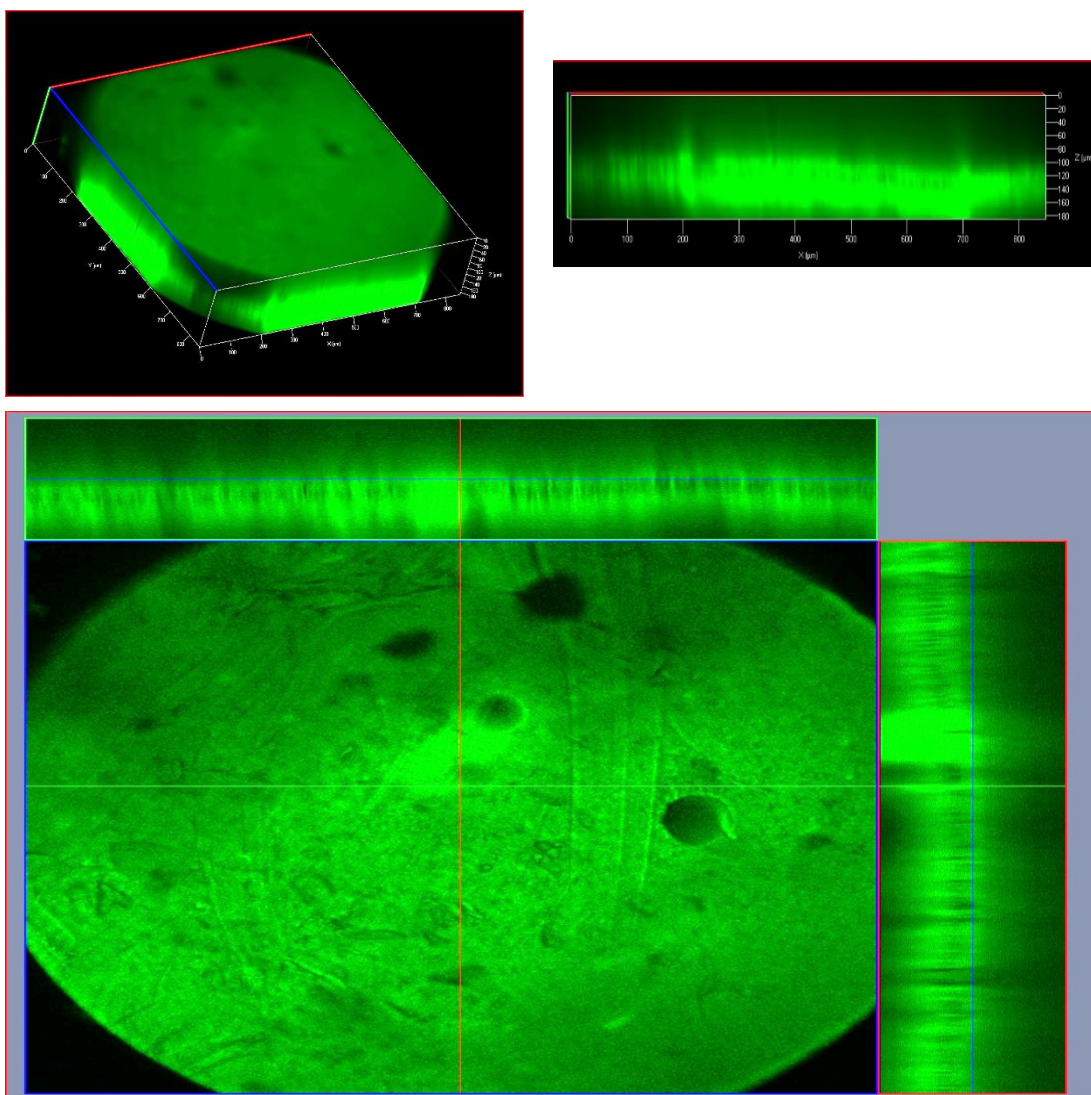
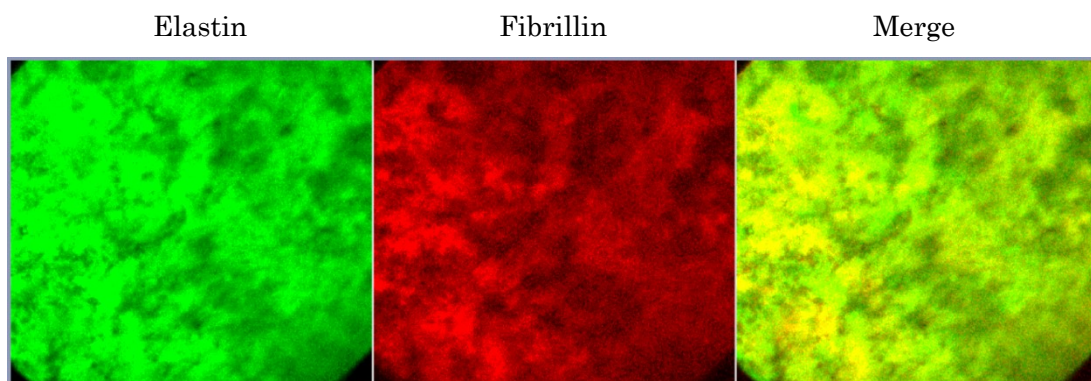


Fig.3-8-7 AX:E=90:10 A:X=80:20 AEX Gel の 2 次元・3 次元画像
貫通孔が確認できた。(Fig.3-8-7)

AX:E=70:30 A:X=80:20

2D image



3D image

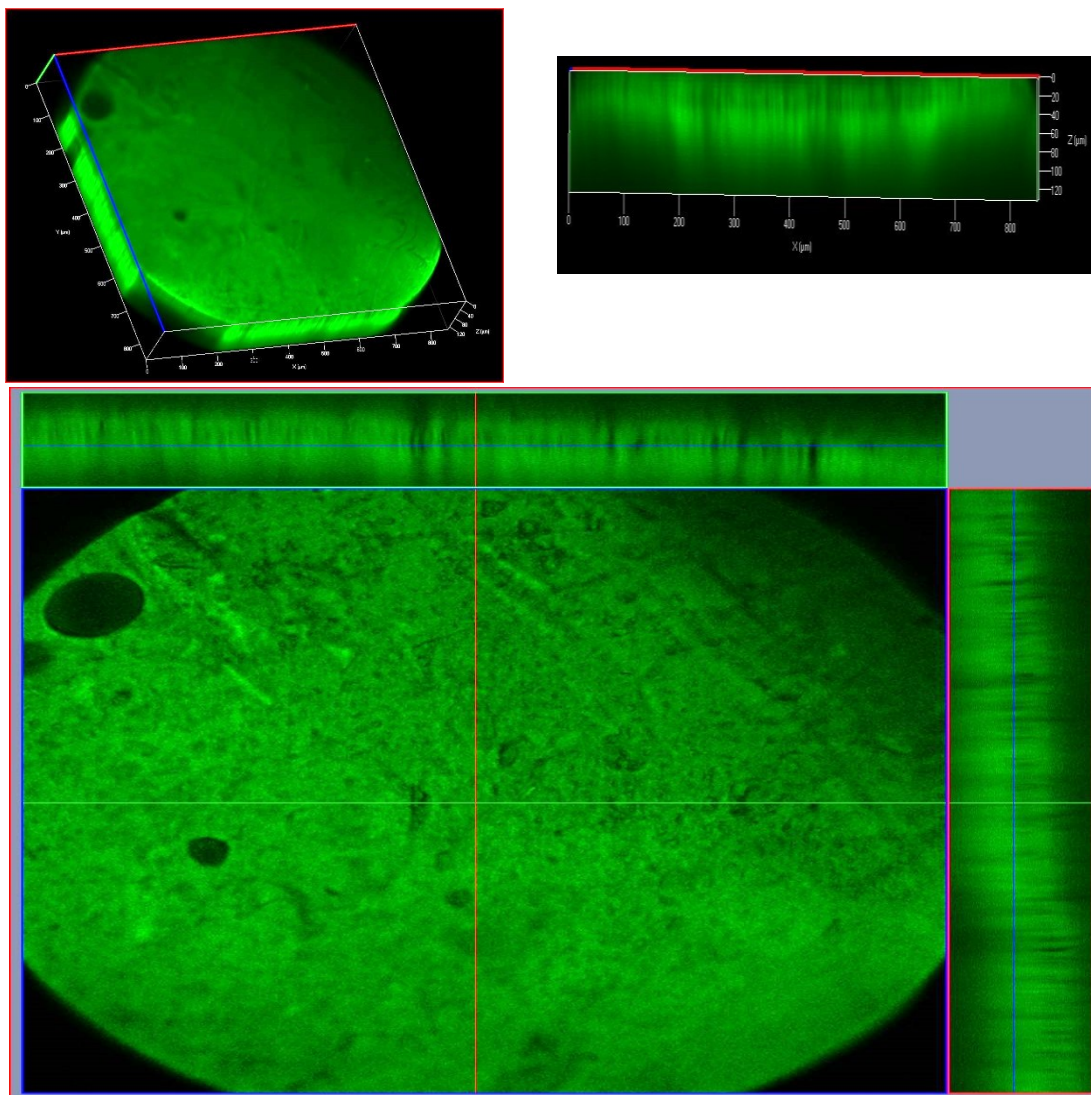
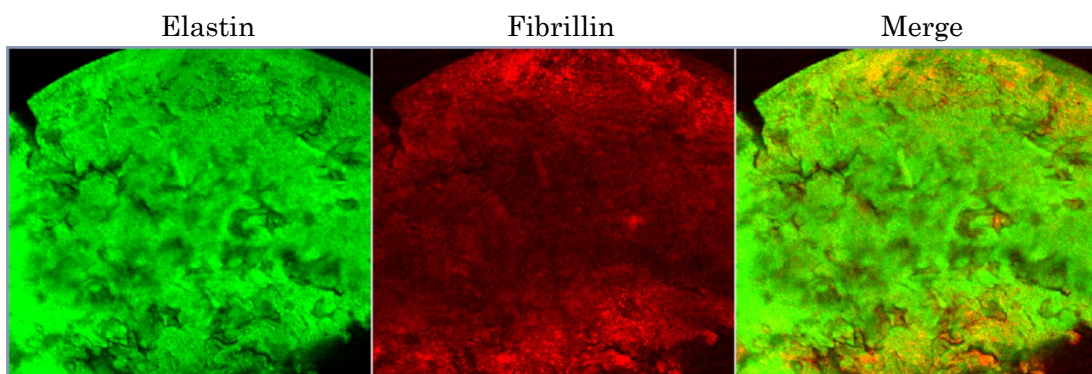


Fig.3-8-8 AX:E=70:30 A:X=80:20 AEX Gel の 2 次元・3 次元画像
貫通孔が確認できた。(Fig.3-8-8)

AX:E=50:50 A:X=80:20

2D image



3D image

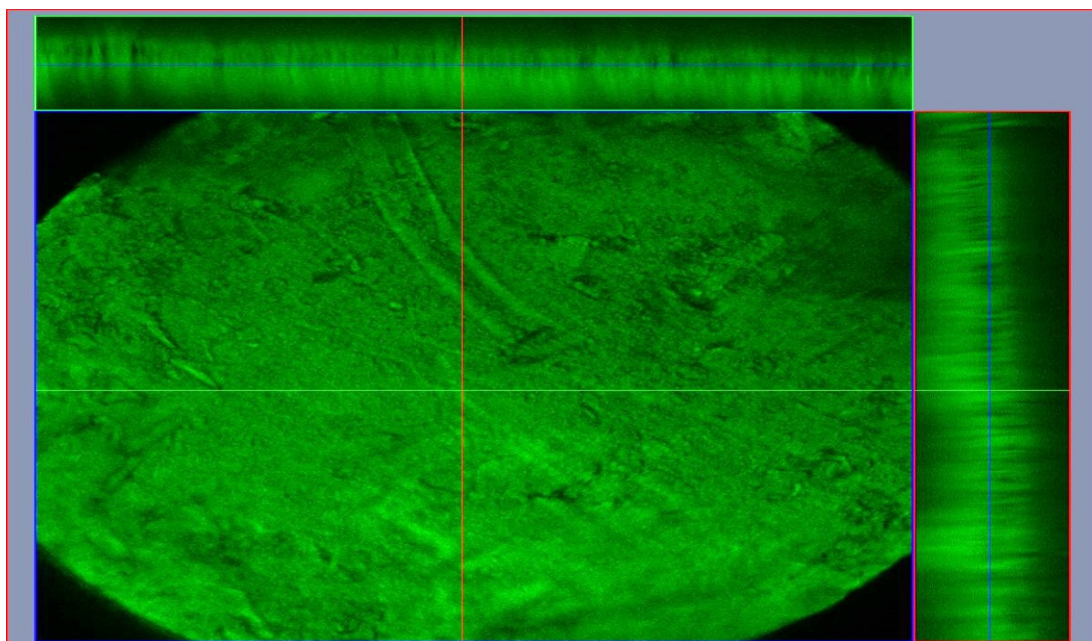
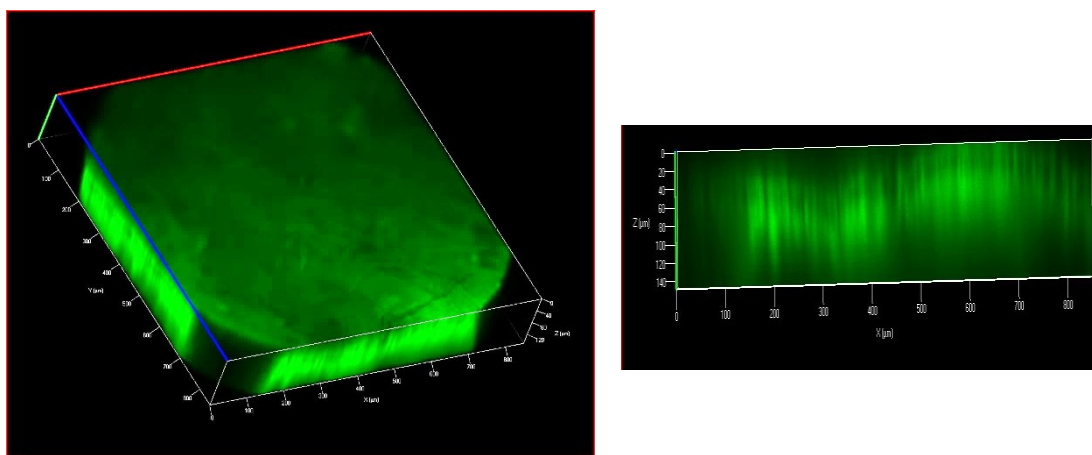


Fig.3-8-9 AX:E=50:50 A:X=80:20 AEX Gel の 2 次元・3 次元画像
貫通孔が確認できた。(Fig.3-8-9)

また、異なる顕微鏡でも撮影を行った(KEYENCE BZ-X700)。

3D image

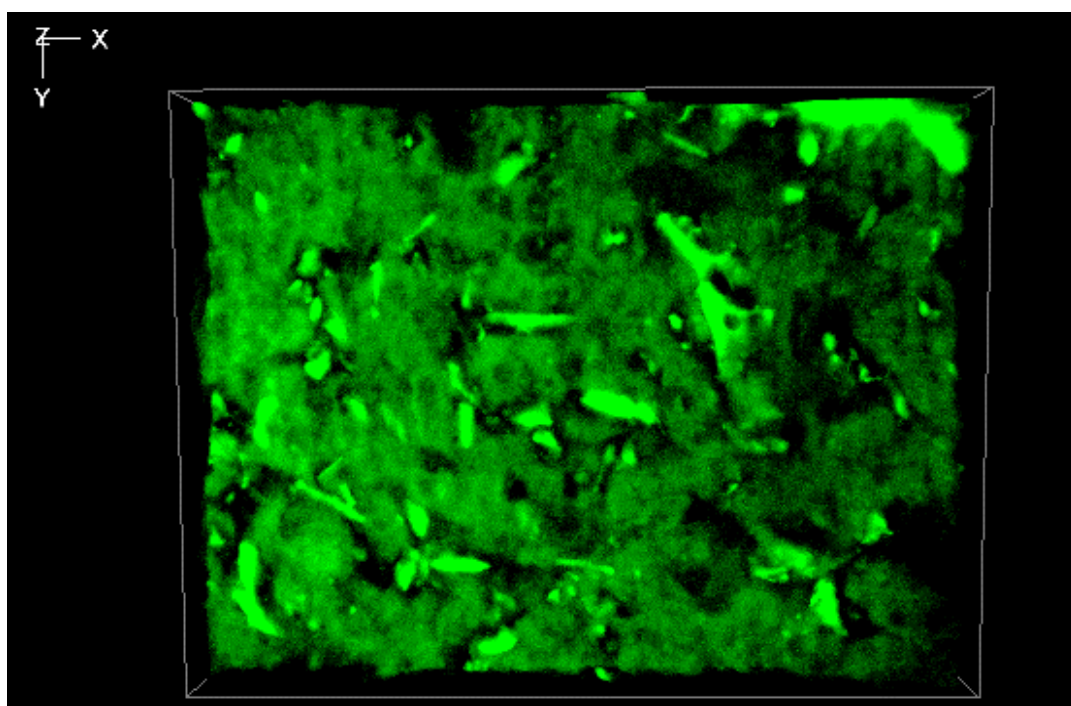
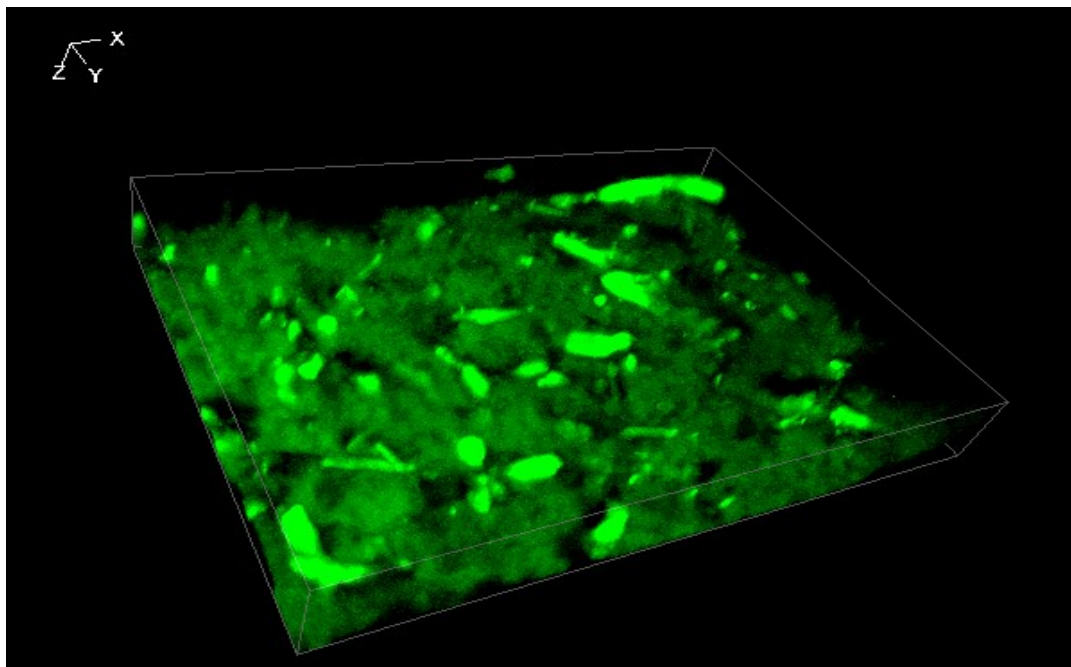


Fig.3-8-10 KEYENCE BZ-X700 での画像 (AX:E=50:50 A:X=10:90)

AX:E=50:50 A:X=10:90 で貫通孔が観察できた。(Fig.3-8-10)

3-9 細胞毒性試験

3-9-1 Dode-DSP による細胞毒性試験

ヒト皮膚線維芽細胞(P15)を培養後、培地を取り除き Dode-DSP 添加 DMEM を加えた。Dode-DSP 濃度は 0.01mM・0.1mM・1mM・10mM・50mM で、0h、1h、2h で観察した。2 時間後、トリパンプルー染色 (TB) を行った。

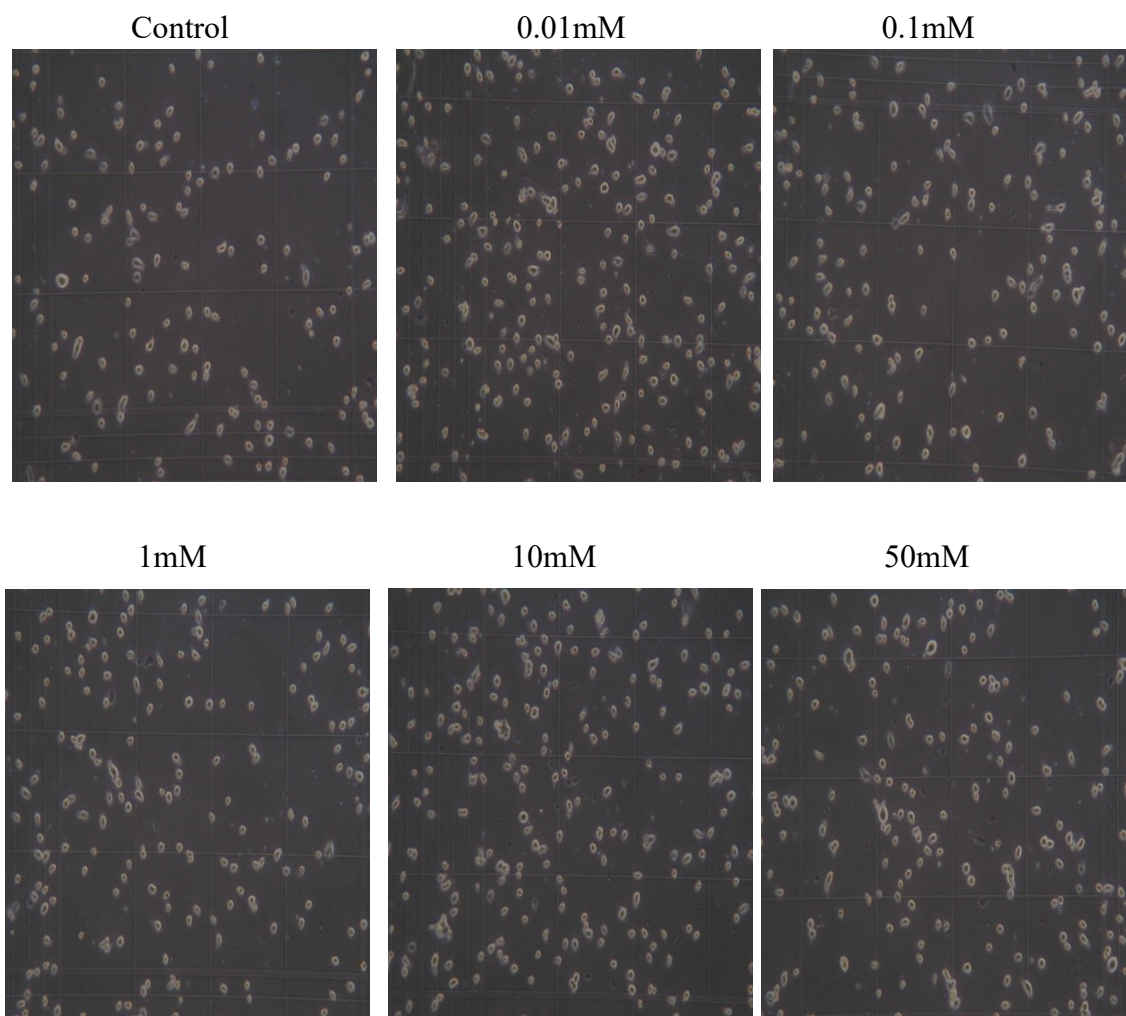


Fig.3-9-1 Dode-DSP 毒性試験 (トリパンプルー染色)

血球計算版で生細胞と死細胞数をカウントした。

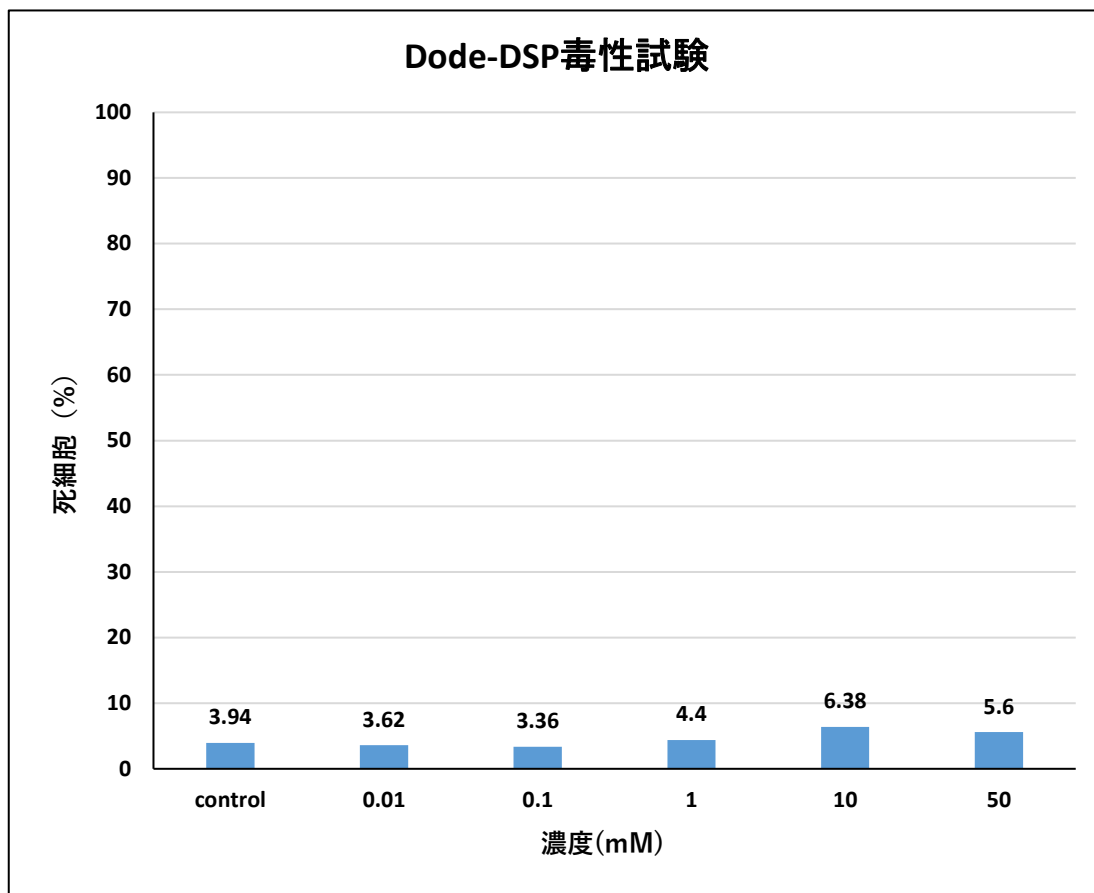


Fig.3-9-2 Dode-DSP 死細胞率

Dode-DSP 濃度を高くしても死細胞の数はあまり変化しなかった。(Fig.3-9-2)

3-9-2 DSP による細胞毒性試験

ヒト皮膚線維芽細胞(P14)を培養後、培地を取り除き DSP 添加 DMEM を加えた DSP 濃度は 1mM・10mM・50mM・300mM で、0h、1h、2h で観察した。2 時間後、トリパンプルー染色 (TB) を行った。

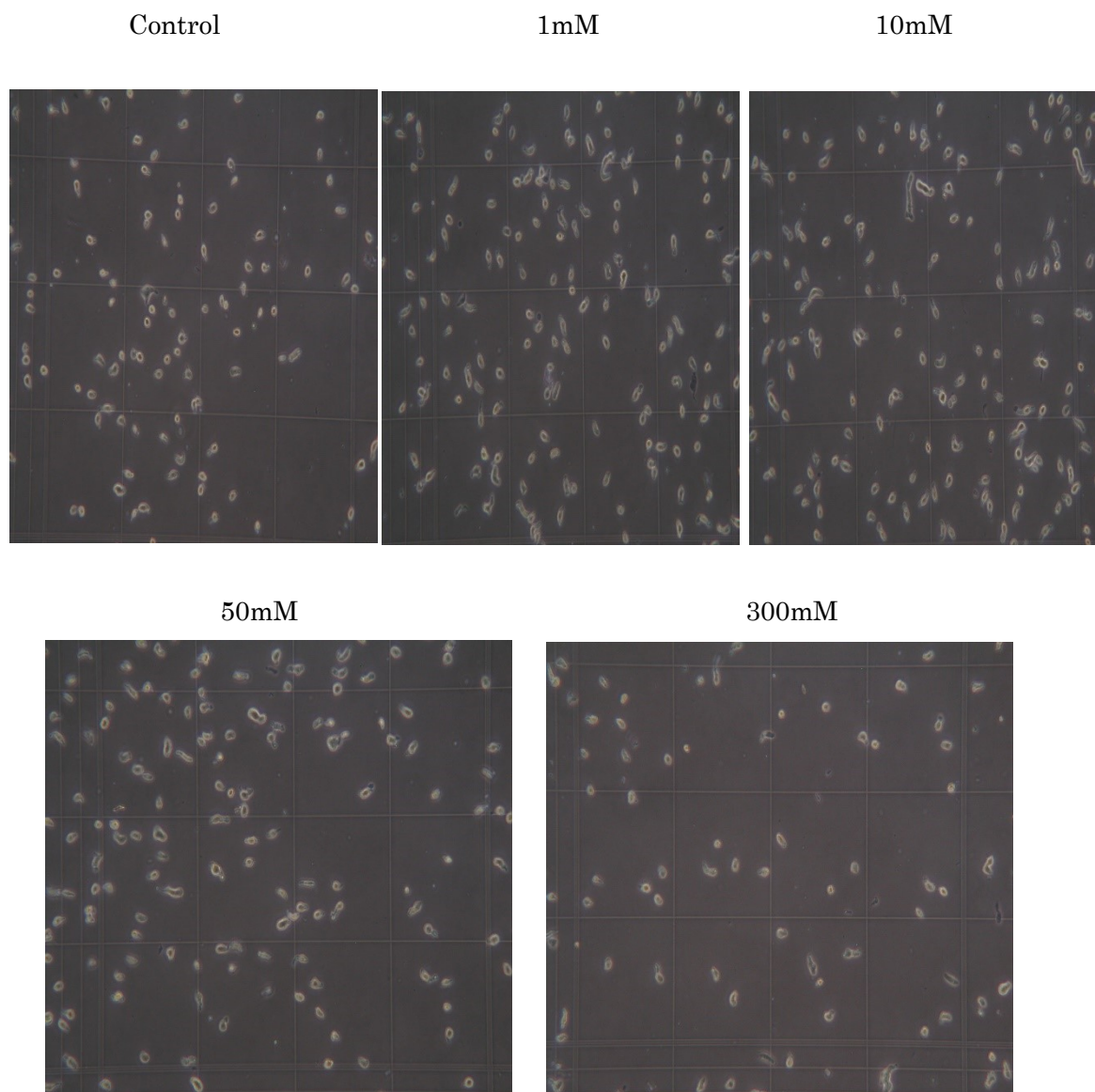


Fig.3-9-3 DSP 毒性試験 (トリパンプルー染色)

血球計算版で生細胞と死細胞数をカウントした。

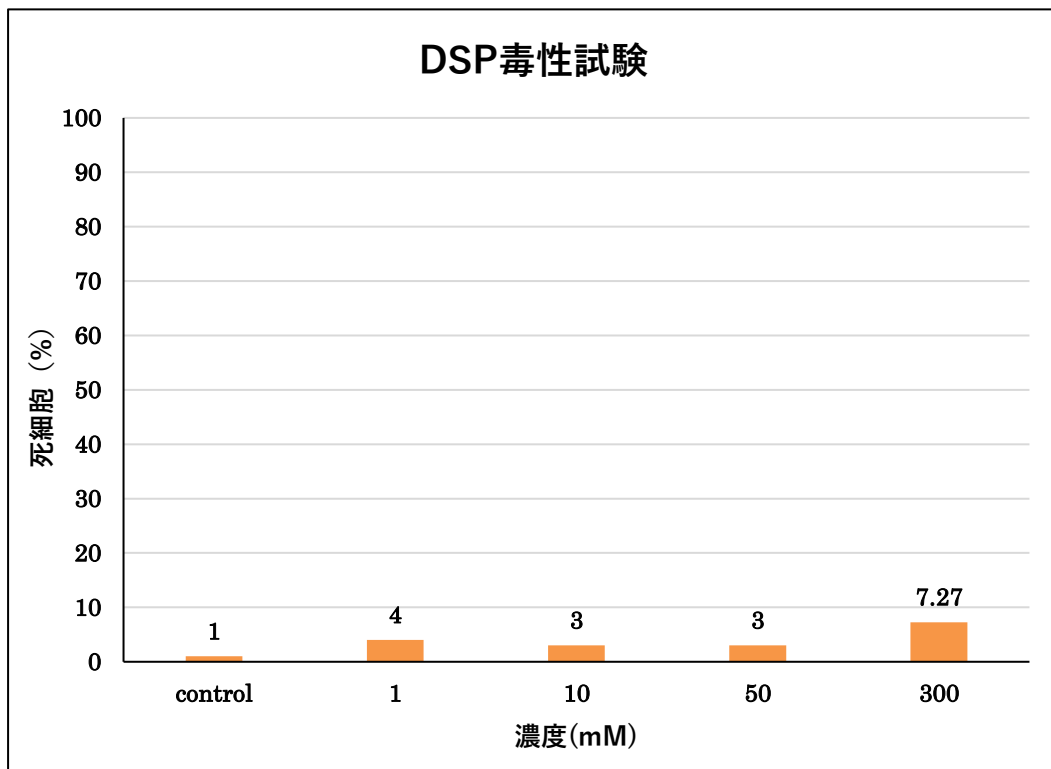
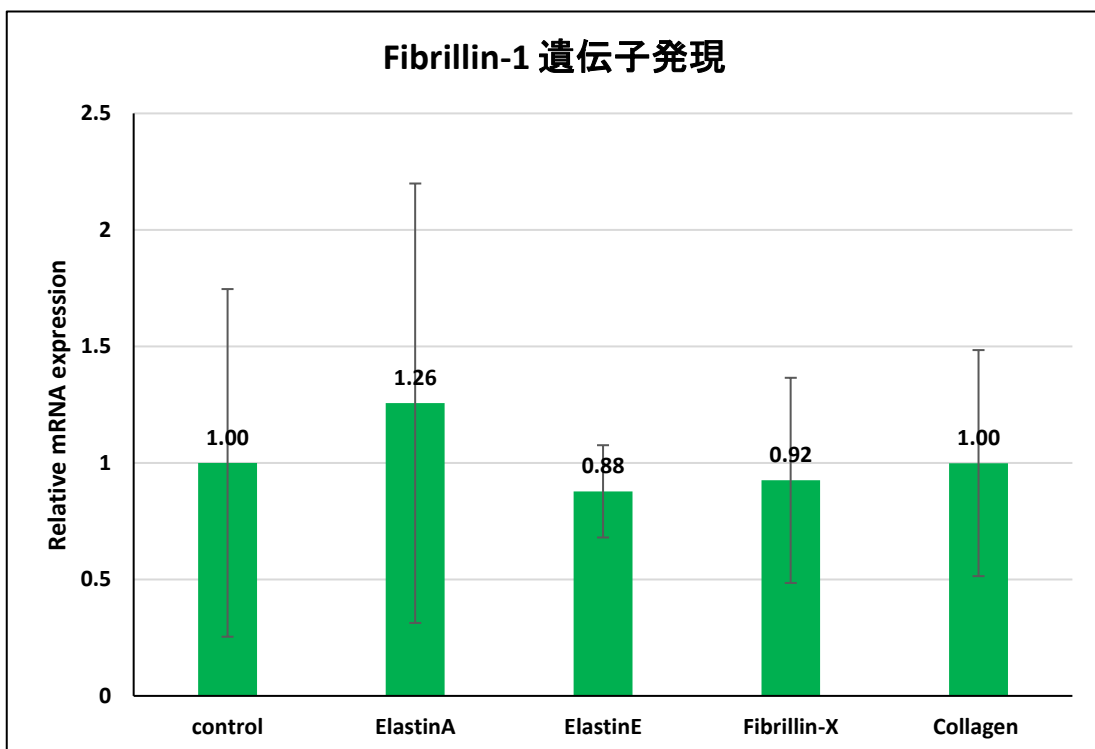
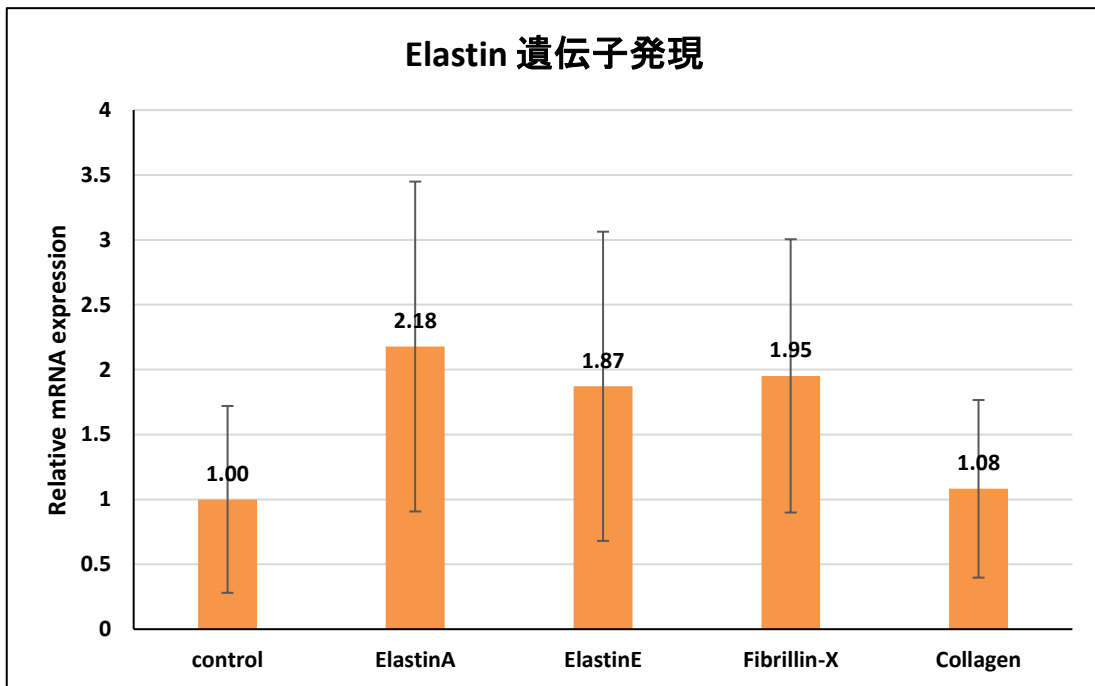


Fig.3-9-4 DSP 死細胞率

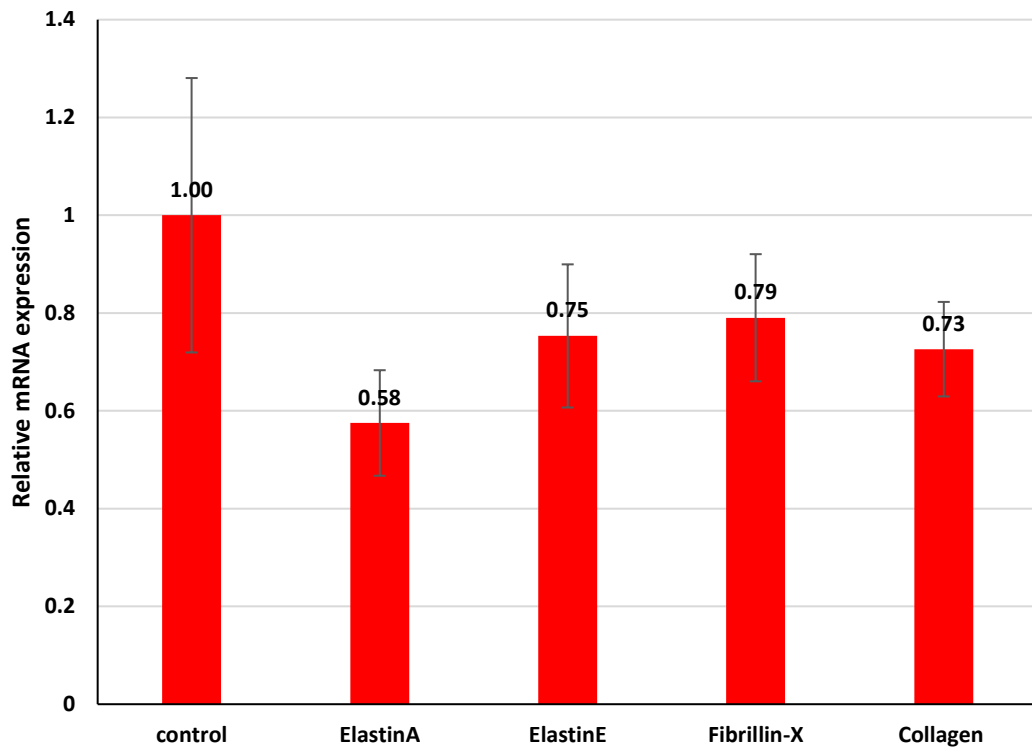
DSP 濃度を高くしても死細胞の数はあまり変化しなかった。(Fig.3-9-4)

3-10 2次元培養後の Real-Time PCR による遺伝子発現解析

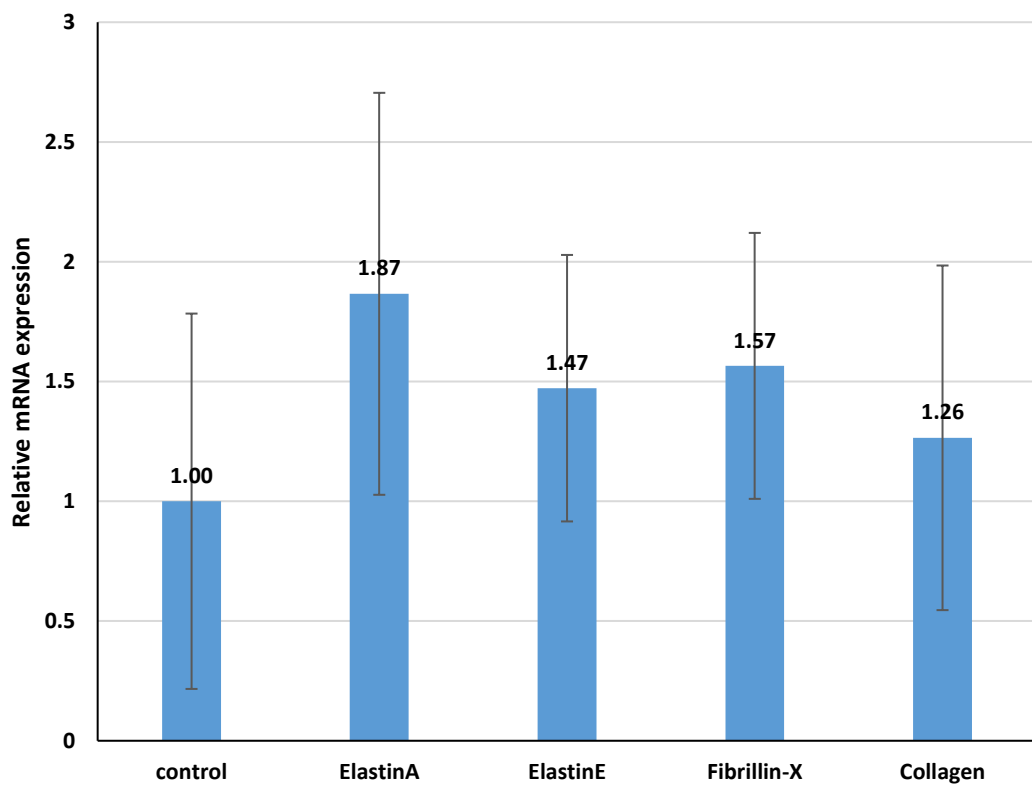
ヒト皮膚線維芽細胞を ElastinA、ElastinE、Fibrillin-X、Collagen をコーティングしたシャーレで 2day 培養(細胞接着後 1day 培養)し、弾性線維関連遺伝子である Elastin、Fibrillin-1、Lysyl Oxidase、膠原線維関連遺伝子である Collagen I、筋線維芽マーカーである α SMA の遺伝子発現を確認した。



Lysyl oxidase 遺伝子発現



Collagen I 遺伝子発現



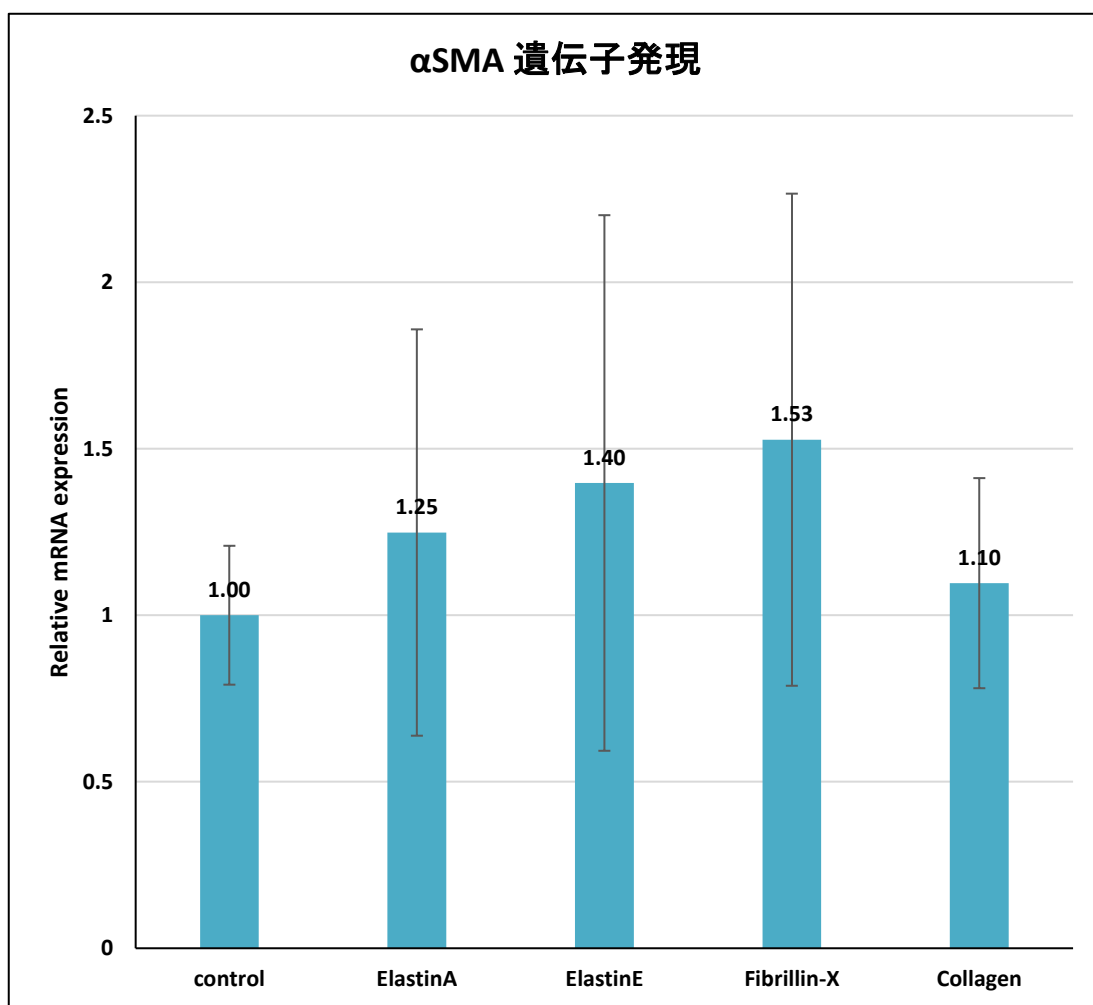


Fig.3-10-1 ECM コーティングシャーレ培養後の遺伝子発現解析

Elastin、Collagen I、 α SMA は全てのコーティングシャーレで遺伝子発現が上昇した。Fibrillin-1 は ElastinA コーティングシャーレで上昇した。Lysyl Oxidase は全てのコーティングシャーレで遺伝子発現が減少した。(Fig.3-10-1)

3-11 Hydro Gel 内での細胞の3次元培養

3-11-1 PicoGreen Assay による細胞増殖試験

PicoGreen Assay によってハイドロゲル内で 3 次元培養した細胞の増殖を確認した。ゲルの作製条件は Table.3-11-1 に示した。3 次元培養後培地を抜き取り、エラスターゼを加えゲルを分解した。ゲル分解後の上澄み(ゲル上澄み)と沈殿(ゲル沈殿)、エラスターゼを加える前に抜き取った培地に対して PicoGreen Assay を行った。

Table.3-11-1 細胞包埋ゲルの作製条件

	A Gel A=100	AE Gel A:E=50:50	AEX Gel AX:E=70:30 A:X=80:20
ElastinA(mg)	24	12	13.44
ElastinE(mg)	0	12	7.2
Fibrillin-X(mg)	0	0	3.36
Dode-DSP(μ l) (363.7mM)	8.88	8.88	8.88
細胞(μ l) (50000cells)	11.18	11.18	11.18
10%FBS+DMEM(μ l)	9.6	9.6	9.6
Na ₂ CO ₃ aq(μ l) (500mM)	5.76	5.76	5.76

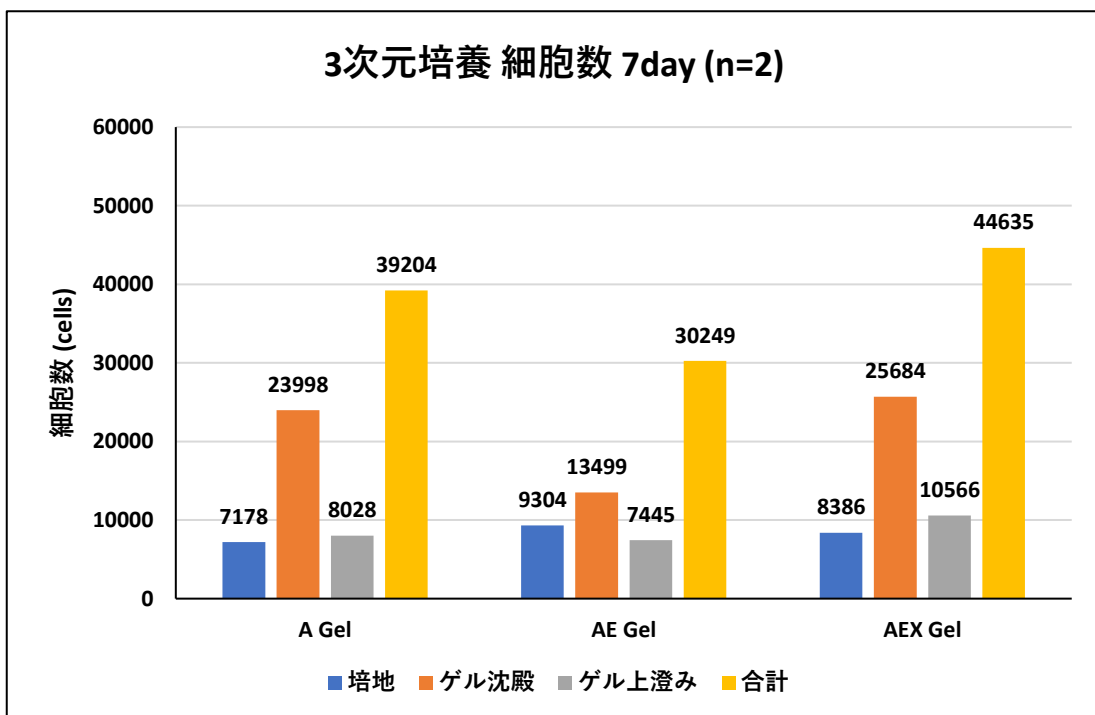
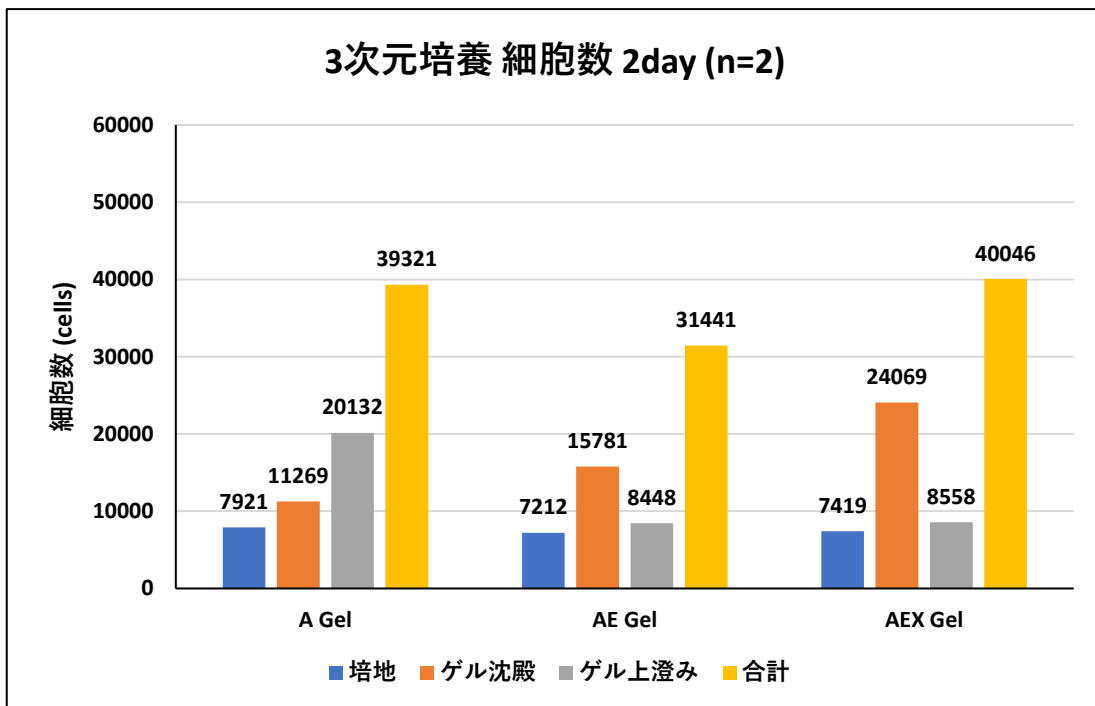


Fig.3-11-1 PicoGreen Assay による細胞増殖試験

A GelとAE Gelは2日と7日間で細胞数に大きな変化はなかった。AEX Gelは2日より7日培養の方がわずかに細胞数が増加した。(Fig.3-11-1) 試験回数が少ないため再試験を行う必要があると考える。

3-11-2 3次元培養後の Real-Time PCR による遺伝子発現解析

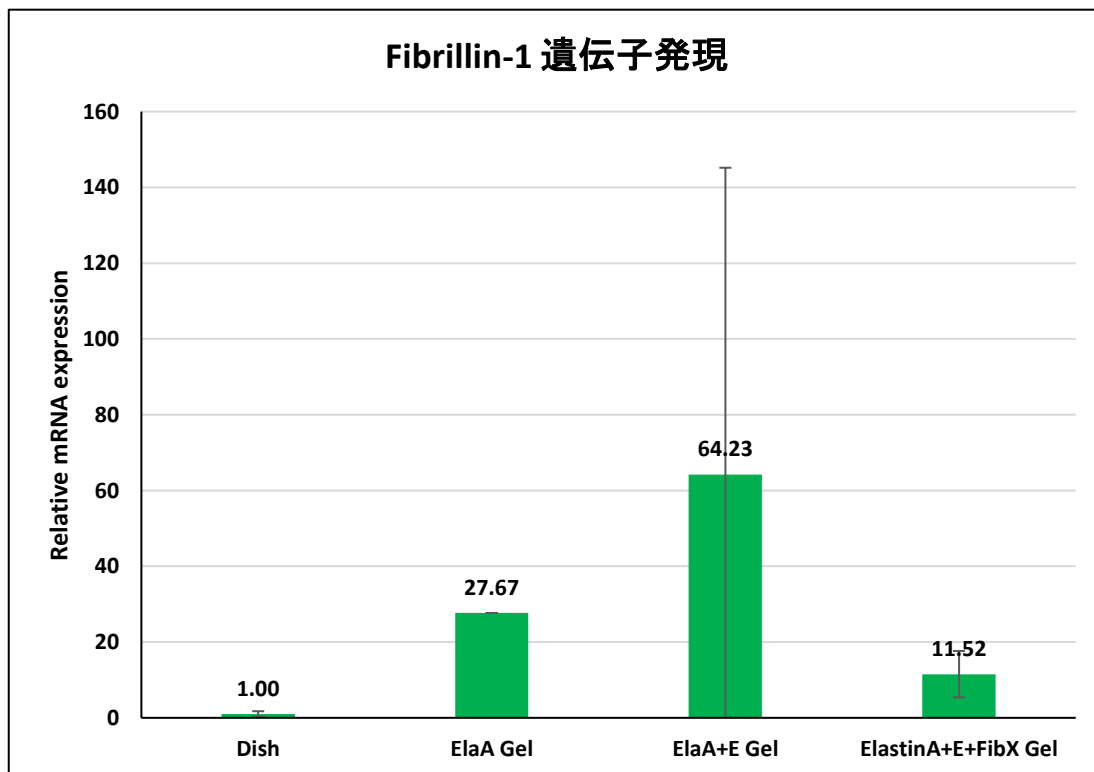
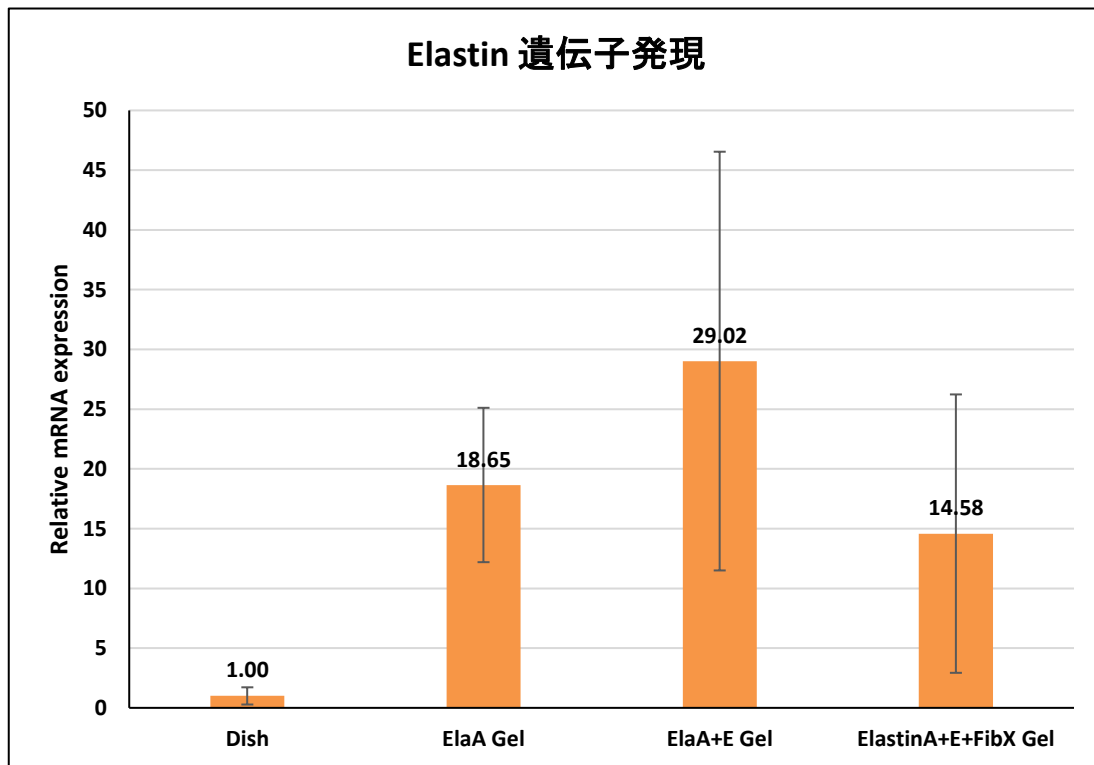
Table.3-11-2 のようにゲルを作製し 3次元培養を行った後、ゲルを液体窒素で凍結し乳鉢で粉碎した。RNA を抽出後 Real-Time PCR を行った。培養は 1 日で行った。

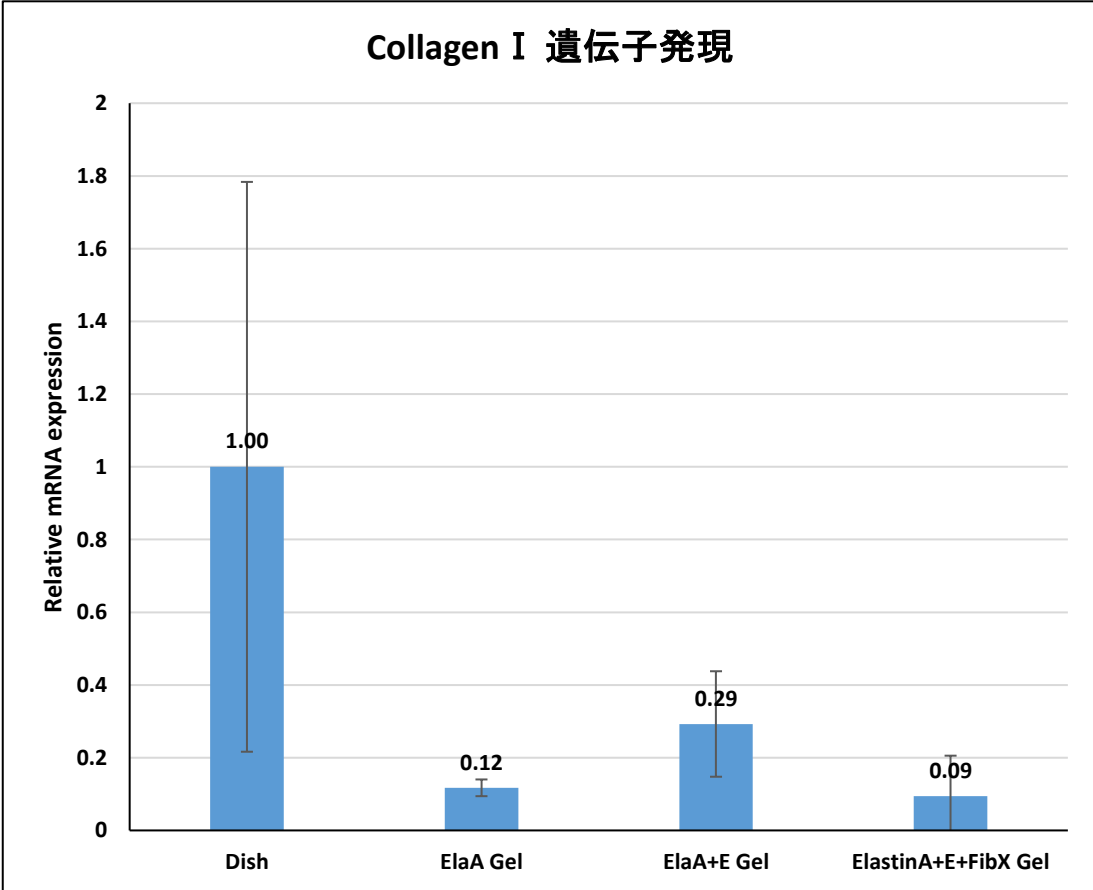
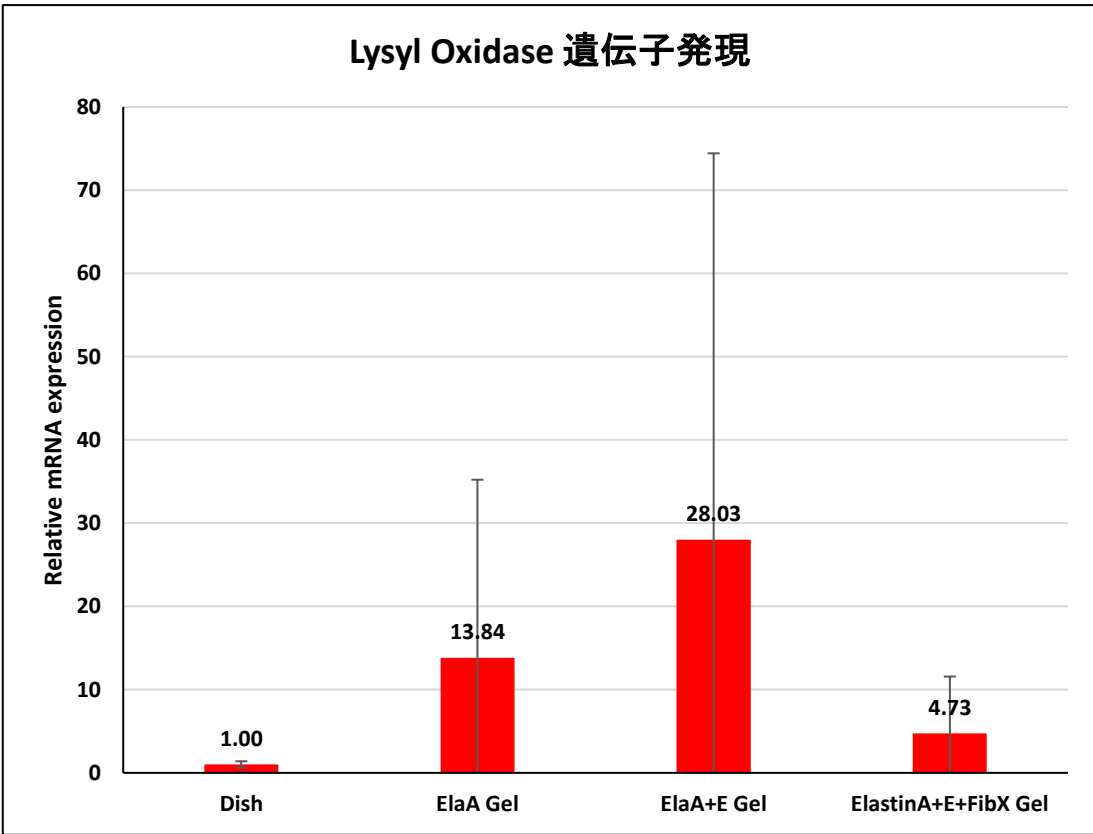
Table.3-11-2 Gel の作製条件

	A Gel A=100	AE Gel A:E=50:50	AEX Gel AX:E=70:30 A:X=80:20
ElastinA(mg)	48	24	26.88
ElastinE(mg)	0	24	14.4
Fibrillin-X(mg)	0	0	6.72
Dode-DSP (μ l) (340.1mM)	18.98	18.98	18.98
細胞懸濁液 (40000cells)	34.84	34.84	34.84
DMEM	6.66	6.66	6.66
Na ₂ CO ₃ aq(μ l) (500mM)	11.52	11.52	11.52

シャーレでの 2 次元培養の遺伝子発現量と各ゲルでの 3 次元培養後の遺伝子発現量を比較した。

1day 培養





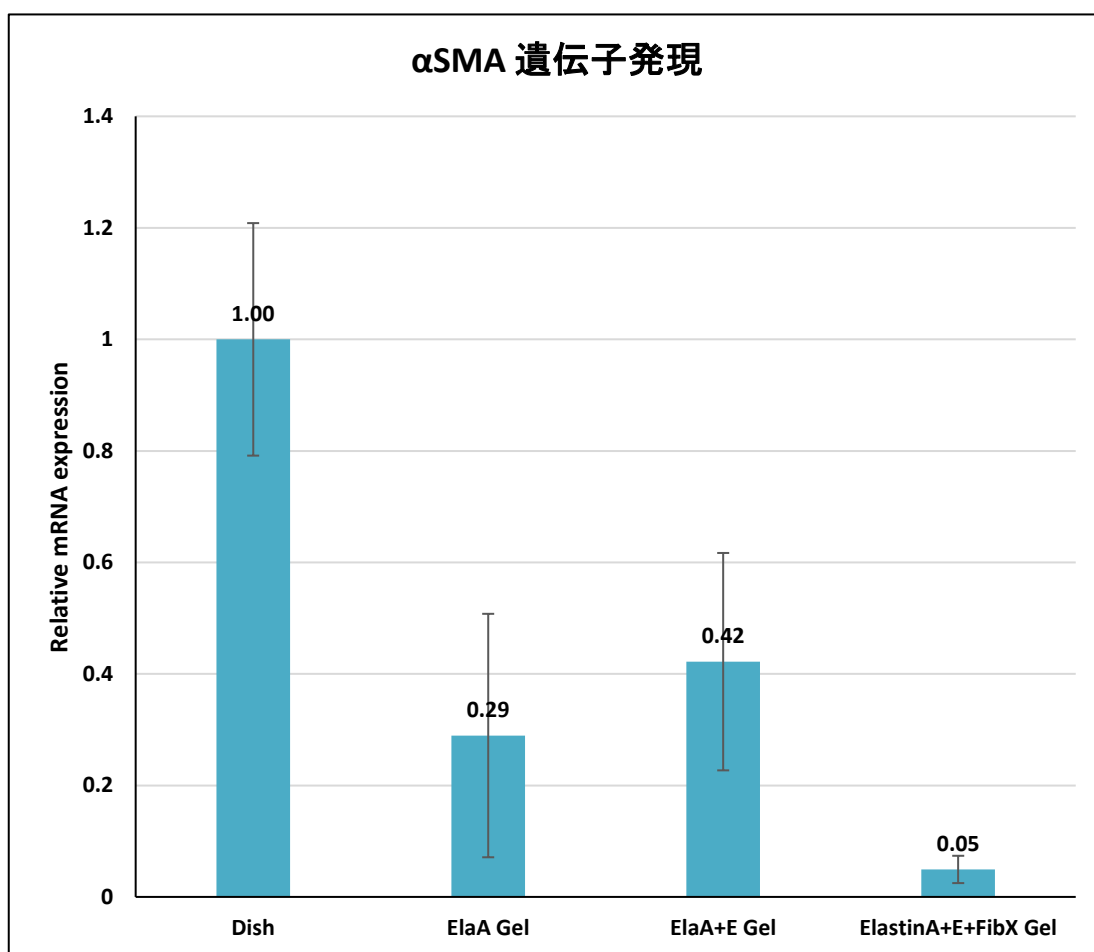


Fig.3-11-2 Dish との相対遺伝子発現 (1day 培養)

弾性線維関連遺伝子である Elastin、Fibrillin-1、Lysyl Oxidase はシャーレでの 2 次元培養よりもゲルでの 3 次元培養の方が遺伝子発現量が上昇していた。しかし、膠原線維関連遺伝子である Collagen I、筋線維芽マーカーである αSMA は遺伝子発現量が減少していた。(Fig.3-11-2)

3-11-3 蛍光顕微鏡による細胞包埋 Gel の観察

Table.3-11-3 のように Gel を作製し 3 次元培養を 1 日行った後、細胞包埋 Gel を蛍光顕微鏡 (KEYENCE/BZ-X700) で観察した。Elastin は自家蛍光、細胞核は PI によって核染色を行うことで観察し、3 次元画像を撮影した。

Table.3-11-3 Gel の作製条件

	A Gel A=100	AE Gel A:E=50:50	AEX Gel AX:E=70:30 A:X=80:20
ElastinA(mg)	24	12	13.44
ElastinE(mg)	0	12	7.2
Fibrillin-X(mg)	0	0	3.36
Dode-DSP (μl) (340.1mM)	8.88	8.88	8.88
細胞懸濁液 (50000cells)	15.00	15.00	15.00
DMEM	6.4	6.4	6.4
Na ₂ CO ₃ aq(μl) (500mM)	5.76	5.76	5.76

A Gel

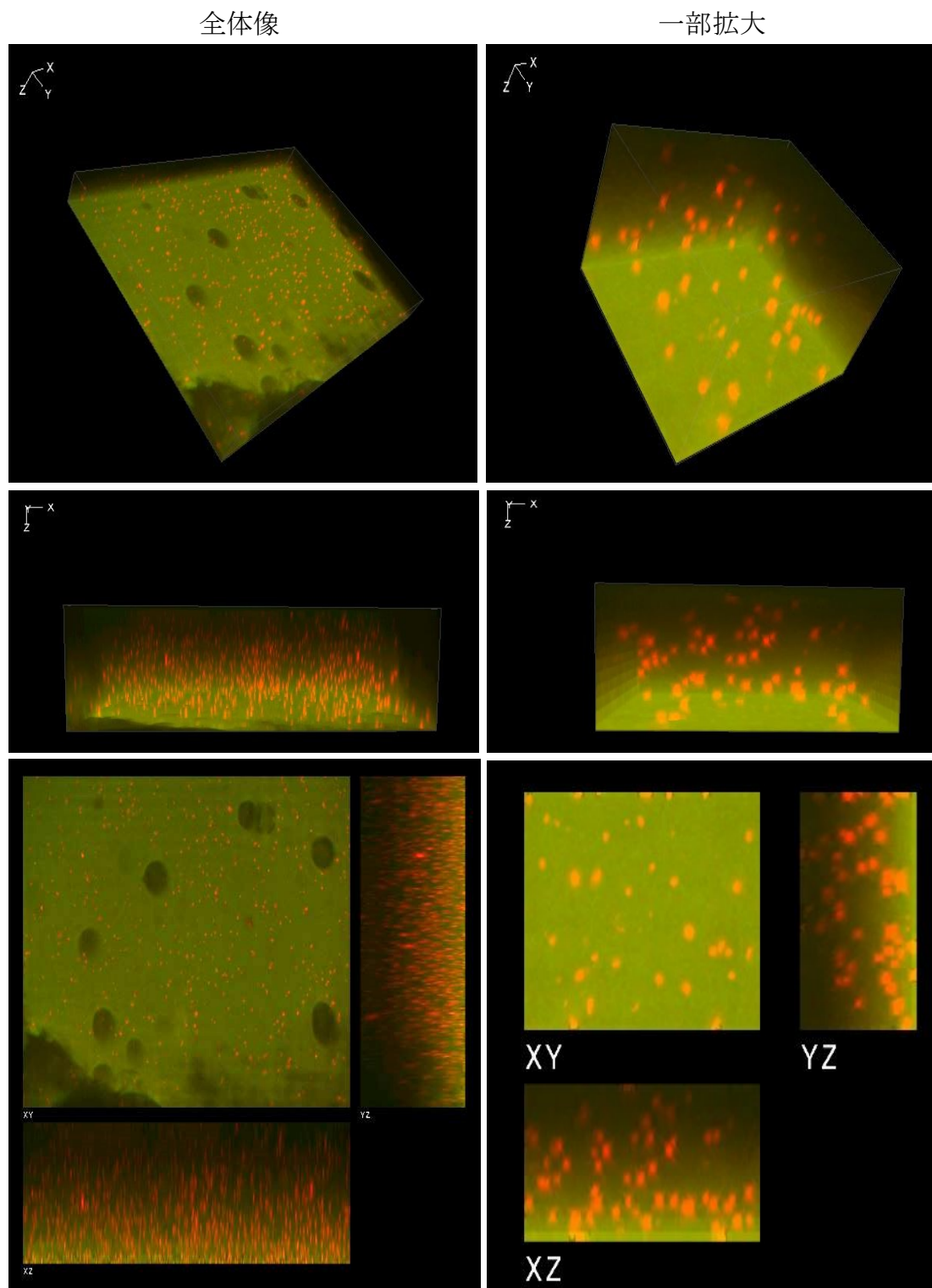


Fig.3-11-3 細胞包埋 ElastinA Gel (A Gel) の 3 次元画像
(Green=Elastin, Red=細胞核)

細胞はゲルの全体に散らばって存在していた。(Fig.3-11-3)

AE Gel

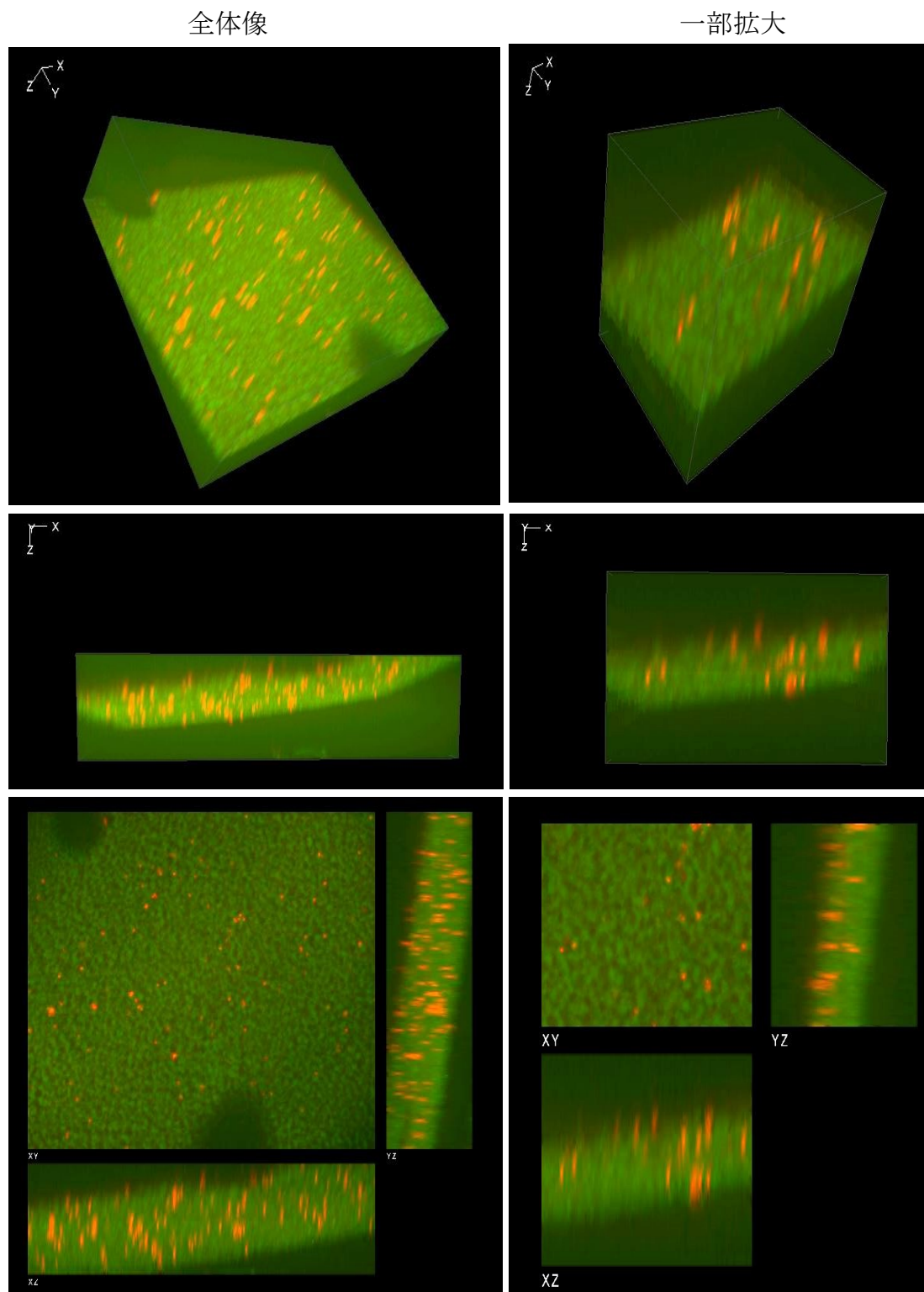


Fig.3-11-4 細胞包埋 ElastinA+ElastinE Gel (AE Gel) の 3 次元画像
(Green=Elastin, Red=細胞核)

細胞はゲルの全体に散らばっており、孔の近くに存在していた。(Fig.3-11-4)

AEX Gel

全体像

一部拡大

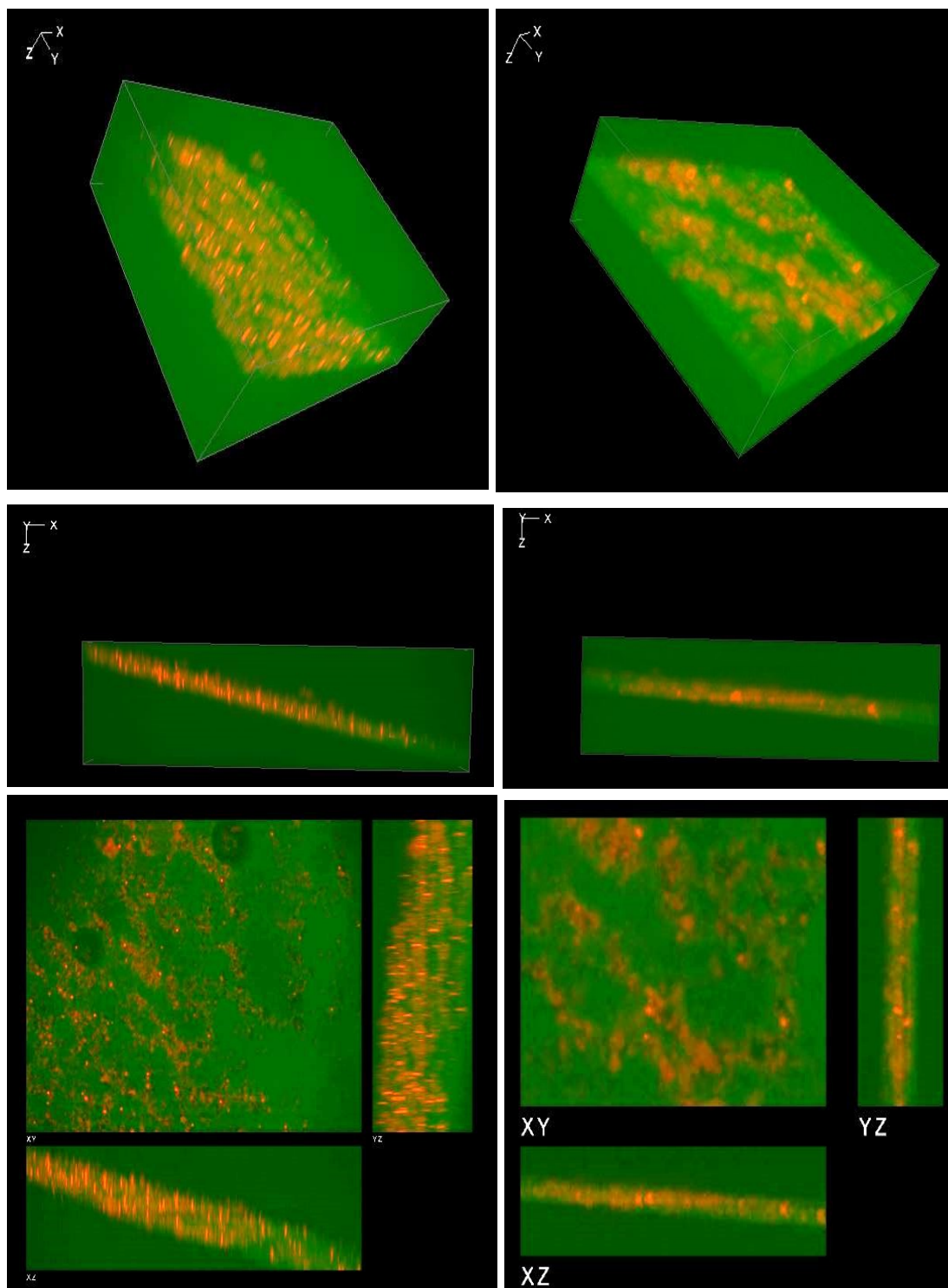


Fig.3-11-5 細胞包埋 ElastinA+ElastinE+Fibrillin-X Gel (AEX Gel) の 3 次元画像
(Green=Elastin, Red=細胞核)

細胞はゲルの全体に散らばっており、孔の近くに存在していた。(Fig.3-11-5)

4 章.考察

4-1 水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画

本研究では抽出した水溶性 Fibrillin の様々な特性を測定し、評価を行った。その結果、水溶性 Fibrillin を「Fibrillin-X」、「Fibrillin-Y」、「Fibrillin-Z」の 3 種類にアイソタイプ分画を行った。そのようにアイソタイプ分画を行った過程についてまず述べる。

4-1-1 シュウ酸処理回数の異なる水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成分析

本研究室では不溶性弾性線維にシュウ酸処理を行うことにより、水溶性 Elastin を抽出している。シュウ酸処理回数の違いにより水溶性 Elastin は特性が異なり、弾性率と凝集温度により「ElastinA」、「ElastinB」、「ElastinC」、「ElastinD」、「ElastinE」の 5 種類にアイソタイプ分画を行っている。水溶性 Elastin を抽出する工程の中で、不溶性 Fibrillin が得られる。この不溶性 Fibrillin を 2-メルカプトエタノールで還元処理することで水溶性 Fibrillin を抽出することができる。そして、不溶性 Fibrillin もシュウ酸処理回数の違いにより、色や粘度などが大きく異なり、シュウ酸処理回数の異なる不溶性 Fibrillin より抽出した水溶性 Fibrillin も特性によりアイソタイプ分画できるのではないかと考えた。アイソタイプ分画する上で、まずは抽出したタンパク質が Fibrillin であることを証明するために、アミノ酸組成分析を行った。アミノ酸組成分析の結果より、最小二乗法によって抽出した各水溶性 Fibrillin 中の Elastin と Fibrillin の最適比率を計算した。その結果、シュウ酸処理回数の少ない水溶性 Fibrillin の方が Fibrillin の含有率が高く、シュウ酸処理回数が多くなるにつれて Elastin の含有率が高くなっていった。一方水溶性 Elastin はシュウ酸処理回数が多くなるにつれて得られる水溶性 Elastin 量は多くなっていった。よって、シュウ酸処理を行うことによって不溶性弾性線維は Fibrillin 成分から先に溶解するということが考えられる。溶解が弾性線維の外側から起こるのであれば、弾性線維は以下のような構造となっていることが推測され、弾性線維の外側は Fibrillin が多く、中心部は Elastin が多いと思われる。

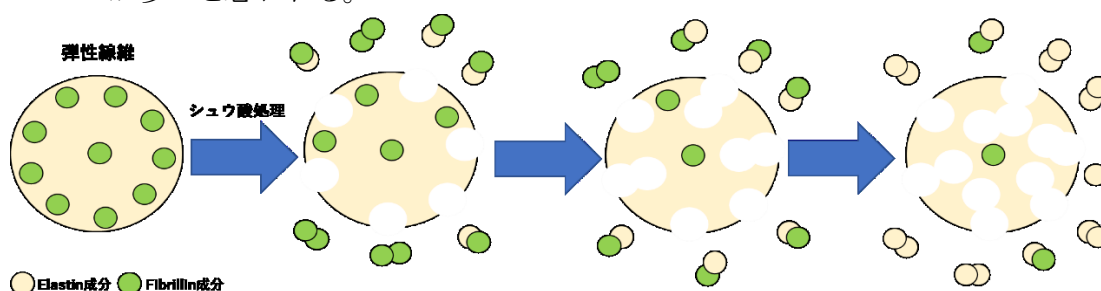


Fig.4-1-1 弾性線維の構造とシュウ酸分解の推測

4-1-2 シュウ酸処理回数異なる水溶性 Fibrillin の弾性率・伸長率・凝集温度

次に、水溶性 Elastin のアイソタイプ分画と同様に弾性率・伸長率・凝集温度の測定を行った。シュウ酸処理回数が少ない水溶性 Fibrillin は弾性率が約 200~約 300kPa と高い値を示し、シュウ酸処理回数が多くなると約 100kPa 以下まで減少した。一方、伸長率はほとんどの水溶性 Fibrillin が 100%以下であり、Fibrillin は強度はあるが伸びないタンパク質であるということが考えられる。また、凝集温度はシュウ酸処理回数が少ないと測定装置の限界温度である 70℃を超えても凝集せず、シュウ酸処理回数が多くなるにつれて約 60℃~約 40℃付近で凝集していた。この 3 種類の特性を水溶性 Elastin と比較すると異なっていることが分かる。そして、Fibrillin は弾性率が非常に高くなっており、Elastin は伸長率が高くなっている。また、シュウ酸処理回数が少ない水溶性 Fibrillin は 70℃以上になっても凝集せず、シュウ酸処理回数が多くなると凝集していた。そのため、コアセルベーション(凝集)は Elastin 特有の物性であることも確認できた。そして、シュウ酸処理回数が多い Fibrillin は凝集したため Elastin 成分も混ざっていると思われる。以上をまとめると抽出した水溶性 Fibrillin は水溶性 Elastin とは異なるタンパク質であるということが証明された。以上のことより考察すると、生体内の弾性線維は伸縮性を Elastin が保ち、強度は Fibrillin が保っていることが考えられる。

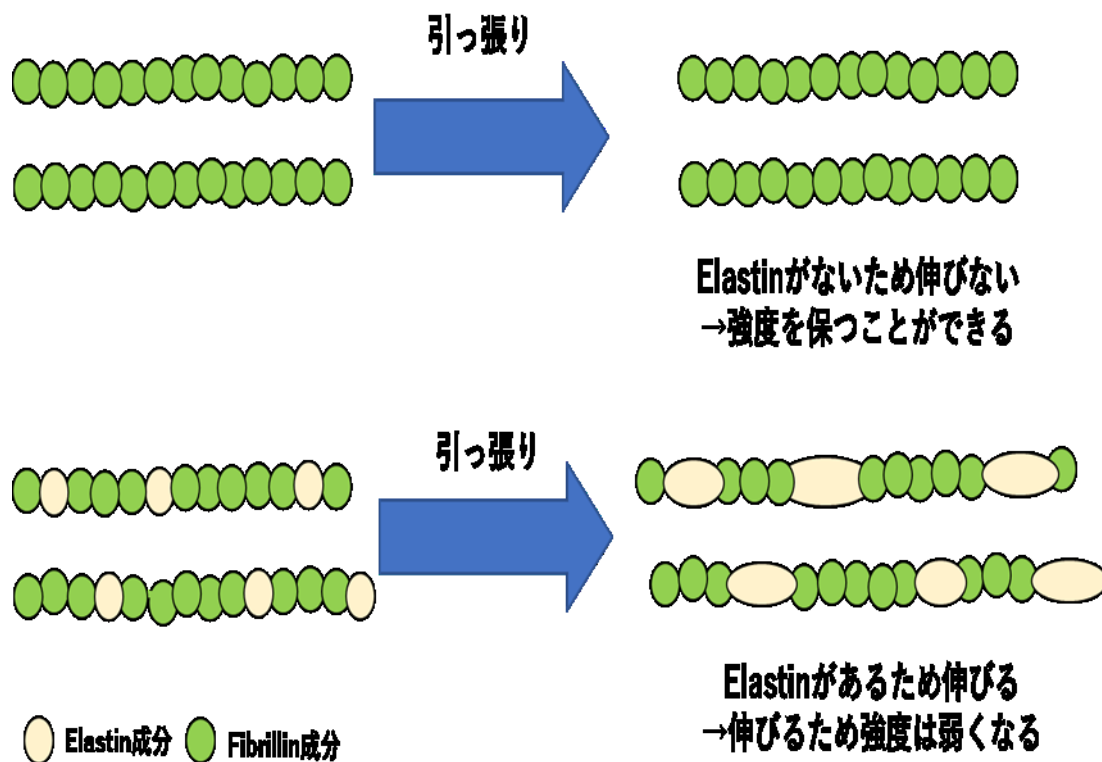


Fig.4-1-2 弾性線維における Elastin と Fibrillin の役割

4-1-3 シュウ酸処理回数異なる水溶性 Fibrillin の分子量

抽出した水溶性 Fibrillin の分子量を知るために SDS-PAGE、抗体への反応を見るために Western blot を行った。まず、SDS-PAGE の結果だが、FBN-411 では反応は見られず、FBN-412~418 では 400kDa 付近、FBN-419~4112 は 400kDa 付近で高い反応が見られたが、それ以下の 45kDa 付近まで反応が見られた。(Fig.3-3-36) シュウ酸処理回数の前半と後半で分子量範囲が異なっていた。次に Western blot だが、FBN-411~419 では 400kDa 付近の高い分子量の範囲で反応があり、FBN-411~416 ではそれ以下の 45~10kDa 付近でも反応が見られた。(Fig.3-14) Fibrillin-1 抗体に反応したため、抽出した水溶性 Fibrillin は「Fibrillin」であるということが証明できたと考えられる。また、SDS-PAGE において FBN-419~4112 の 400kDa~45kDa の反応には Fibrillin 抗体は反応していなかった。そのため SDS-PAGE でのこの反応はアミノ酸組成分析の結果を用いて考察するとシュウ酸処理回数が多いほど Elastin 含有率が高くなるようになっていたため、Elastin であると考えられる。Fibrillin の分子量は 350kDa であるが、Western blot では 45kDa 以下の範囲でも高い反応があるため、抽出した水溶性 Fibrillin は高分子量のまま抽出されたものと低分子量で抽出されたものが混合しているということが推測される。

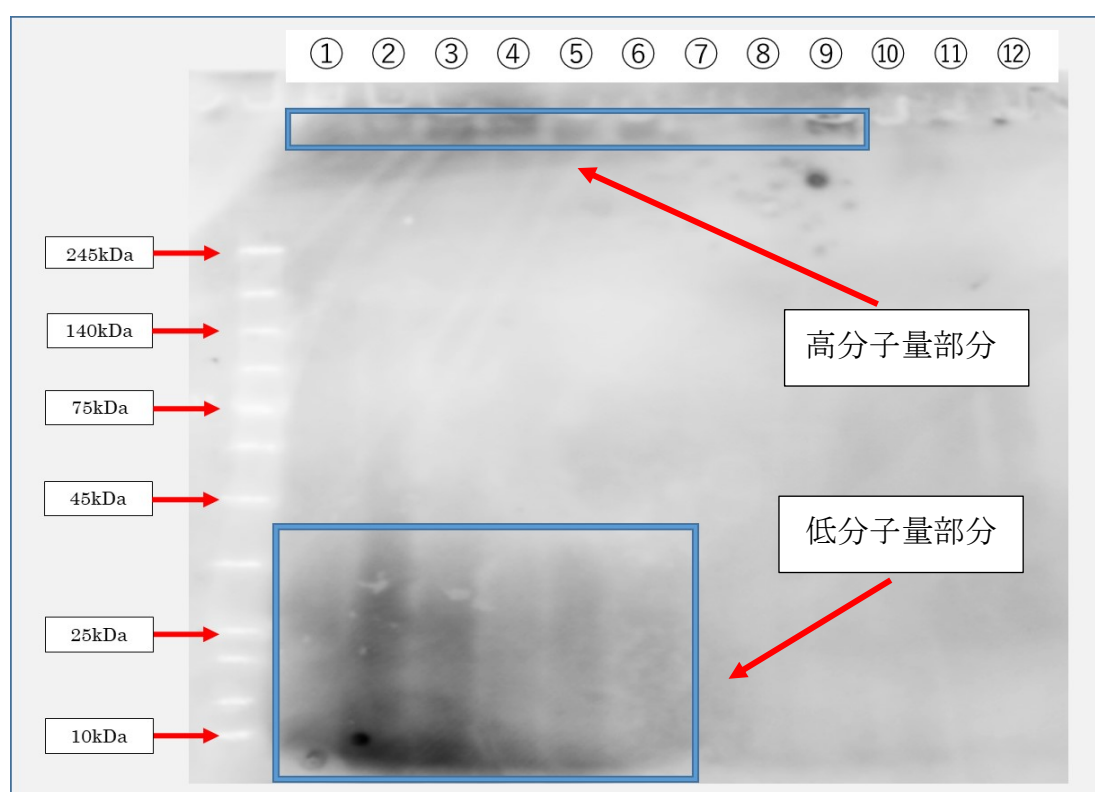


Fig.3-3-36 水溶性 Fibrillin の Western blot

また、分子量を測定するためにゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

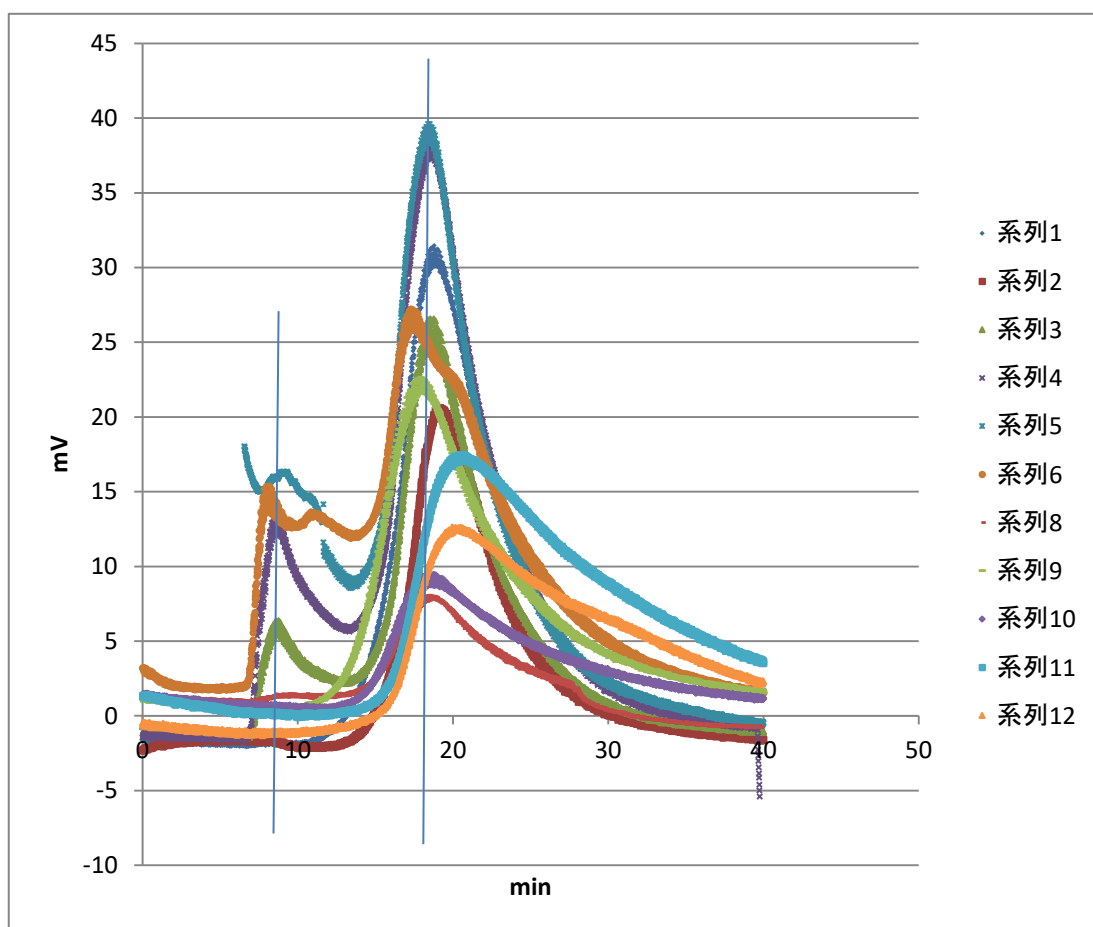


Fig.3-3-63 水溶性 Fibrillin のクロマトグラフィーまとめ
(系列 1~12 は FBN-411~4112 とそれぞれ対応)

FBN-413~419 は BSA のピークが検出されるより前の約 8min と BSA のピークが検出された付近とその後の約 18~20min の 2 回ピークが検出された。よって、FBN-413~419 は BSA 以上と BSA 以下の分子量が混在していることとなる。この結果は Fig.3-3-36 での Western blot の結果と一致している。よって Western blot とゲル濾過クロマトグラフィーの 2 つの結果より、シュウ酸処理回数が異なることで水溶性 Fibrillin の分子量分布は異なることが分かり、シュウ酸処理回数の少ない水溶性 Fibrillin は高分子量と低分子量の二つの分子量分布となっていることが示唆された。

4-1-4 水溶液 Fibrillin と水溶性 Elastin の蛍光波長分布

水溶性 Fibrillin と水溶性 Elastin の最適励起波長と蛍光波長を分光蛍光光度計を値いて測定した。(Fig.3-3-37) 最適波長とピーク値の蛍光波長が Elastin が No.3 から値が大きくなり、水溶性 Fibrillin は No.7 から大きくなっており水溶性 Elastin と同等の値まで上昇した。これはアミノ酸組成分析の結果から水溶性 Fibrillin は No が大きくなるほど Elastin の含有率が高くなっているため、Elastin の特性が出たためであると考えられる。また、異なる濃度の水溶性 Fibrillin (FBN-414) と水溶性 Elastin (PE41-10) の水溶液を作製し、最適励起波長および蛍光波長を測定したところ、濃度依存的に値は上昇していた。(Fig.3-3-38, 39) それぞれの蛍光波長での蛍光強度の平均を計算し、グラフ化したところ Fig.3-3-40 のようになった。

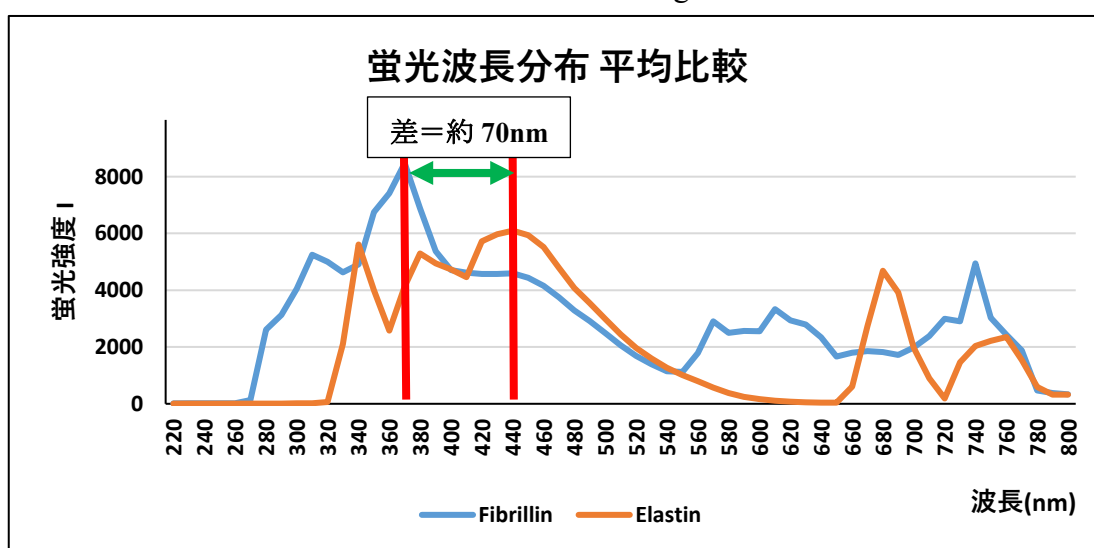


Fig.3-3-40 異なる濃度の水溶性 Fibrillin・Elastin 蛍光波長平均比較

水溶性 Fibrillin と水溶性 Elastin のピーク値の蛍光波長の間には約 70nm の差があることが分かる。本研究では作製したゲルを共焦点レーザー顕微鏡で観察している。その際、抗体や蛍光色素は用いずタンパクの自家蛍光を利用している。その際、Fibrillin は Diode405 (励起波長 = 405nm)、Elastin は Argon488 (励起波長 = 488nm) を用いている。Fig.3-3-41,42 より 40%水溶液時の最適励起波長と蛍光波長はそれぞれ推測すると Fibrillin が 471.6nm、Elastin が 526.858nm であった。この測定条件と今回の測定結果は傾向が一致しており、Fibrillin よりも Elastin の方が波長は大きくなっている。以上の結果より励起波長と蛍光波長は濃度依存的に高くなっているため、タンパク濃度 = 40% で作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察しているゲルの測定条件は正しいと考えられる。

アミノ酸組成分析により Fibrillin:Elastin の割合が分かった。高温架橋 Fibrillin Gelを作製し脱イオン水で洗浄した後、自家蛍光により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。撮影時に輝度を変化させる Gain(Master)の値を 100 刻みで変化させそれぞれ画像を撮影した。撮影後画像解析ソフト「ZEN」を立ち上げ、画像のヒストグラムで表示される算術平均輝度を記録していった。(Fig.3-3-31) その結果、各水溶性 Fibrillin で Elastin の含有率が高いほど線形近似曲線の傾きが大きくなっていった。ElastinA で同様の測定を行ったところ、Fibrillin よりも傾きは大きかった。よって、輝度とサンプルに含まれる Elastin 含有率には高い相関があることが考えられる。この自家蛍光による輝度とアミノ酸組成分析の最適比率決定によって計算した Fibrillin 含有率を組み合わせることにより、抽出した水溶性 Fibrillin 中に含まれる Fibrillin 含有率を推定する検量線を作成したところ、 $R^2=0.7388$ と比較的高い相関が見られた。今後はこの検量線を用いることによって、抽出した水溶性 Fibrillin 中に含まれる Fibrillin 含有率の値をおおよそ推定することができると考えている。

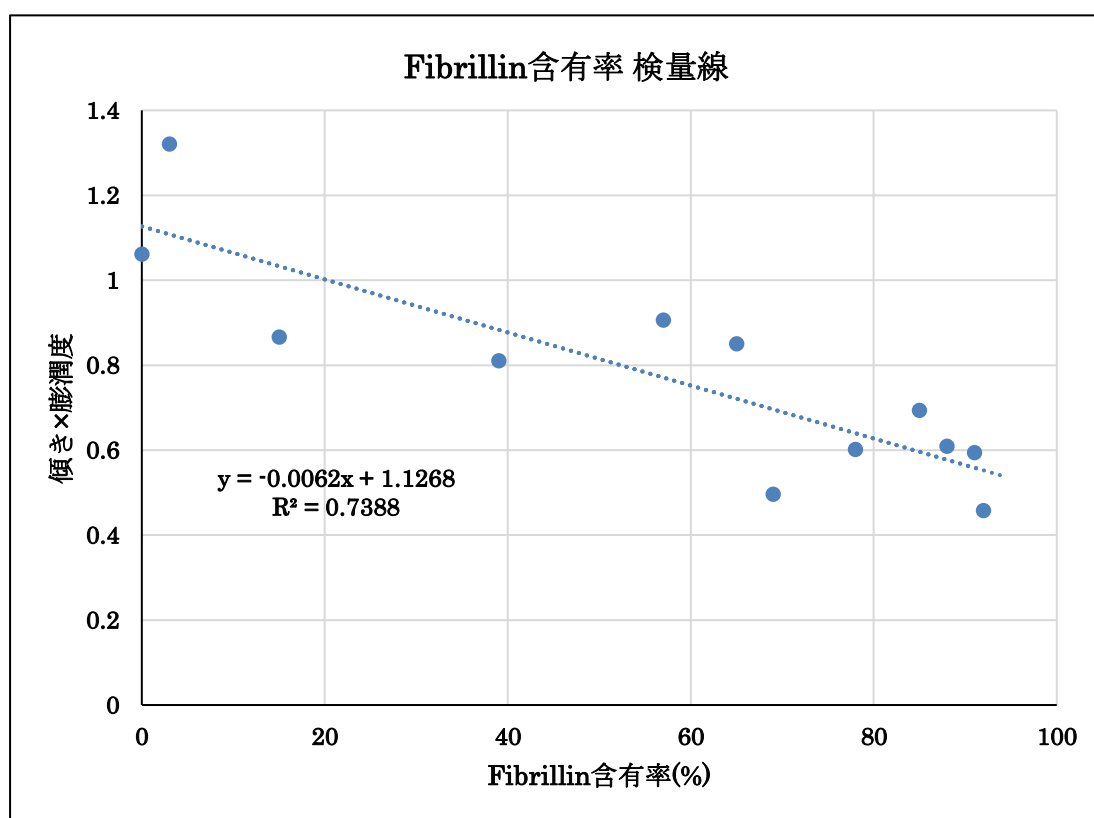


Fig.3-3-32 Fibrillin 含有率検量線

4-1-5 水溶性 Fibrillin のシステインの分解

不溶性弾性線維から得られた不溶性 Fibrillin に対して還元処理を行い抽出された水溶性 Fibrillin のアミノ酸組成分析の結果、ほとんどのアミノ酸の測定値が理論値と類似していた。しかし、システイン、アスパラギン酸の測定値は低いという結果となった。これは過去の本研究室の研究結果と同様である。また、アラニンの測定値は理論値より高いという結果であった。このことより、シュウ酸処理することによりシステイン、アスパラギン酸がアラニンに変化したのではないかと考えた。そこで、システイン、システインの二量体であるシスチン、アスパラギン酸をシュウ酸水溶液で加熱したものと脱イオン水で加熱したもので構造に変化が出たのか NMR によって測定した。

システインとアスパラギン酸は加熱しても変化はなかった。加熱せずシュウ酸水溶液でシスチンを溶解したものを NMR によって測定したが、Fig.3-3-44 のように変化は見られなかった。Fig.3-3-45 のようにシスチンはシュウ酸水溶液で加熱すると変化が見られ、システインとアラニンと思われるピークが確認できた。脱イオン水で加熱したものでは見られなかった。よってシュウ酸水溶液で加熱することによってシスチンのジスルフィド結合が切れシステインになり、さらにアラニンに変化するということが示唆された。不溶性弾性線維のシュウ酸処理時に、この反応が起こっていると考えるなら、アミノ酸組成分析の結果システインの値が低くアラニンの値が高くなっていることは妥当であると思われる。

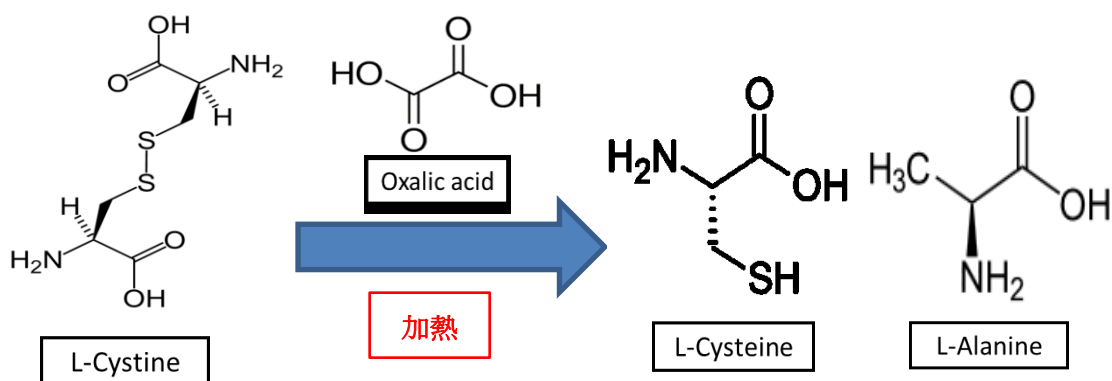


Fig.4-1-3 L-Cystine の加熱シュウ酸処理による分解

また、別の理由としてアミノ酸組成分析の方法も関係していると考えられる。今回依頼したアミノ酸組成分析ではまずサンプルを塩酸加水分解を行った後に、測定を行っている。その際、システインは塩酸加水分解によって分解されてしまう。過ギ酸処理を行うことでシステインを別の誘導体にし、分解を防ぐことができるとされている。しかし、本研究室の結果において過ギ酸処理を行った水溶性 Fibrillin に関してシステインの値は理論値よりも大幅に低くなっていた。そのため、システインは非常に分解押されやすいアミノ酸であると考えられる。次に、アミノ酸組成分析の結果の中で検出された NH₃ に注目した。測定結果より、NH₃ の値が一定量あった。この NH₃ はアミノ酸が分解されて生成されたものであると考えた。アミノ酸代謝分解の経路を見ると、システインやセリンがピルビン酸になる際に NH₃ が発生することが分かっている。(Fig.4-1-4) そのため、アミノ酸の分解で NH₃ が生成されることは十分考えられる。そのため抽出した水溶性 Fibrillin のシステイン値が理論値よりも大きく下回っていることはこのことが原因であると考えている。

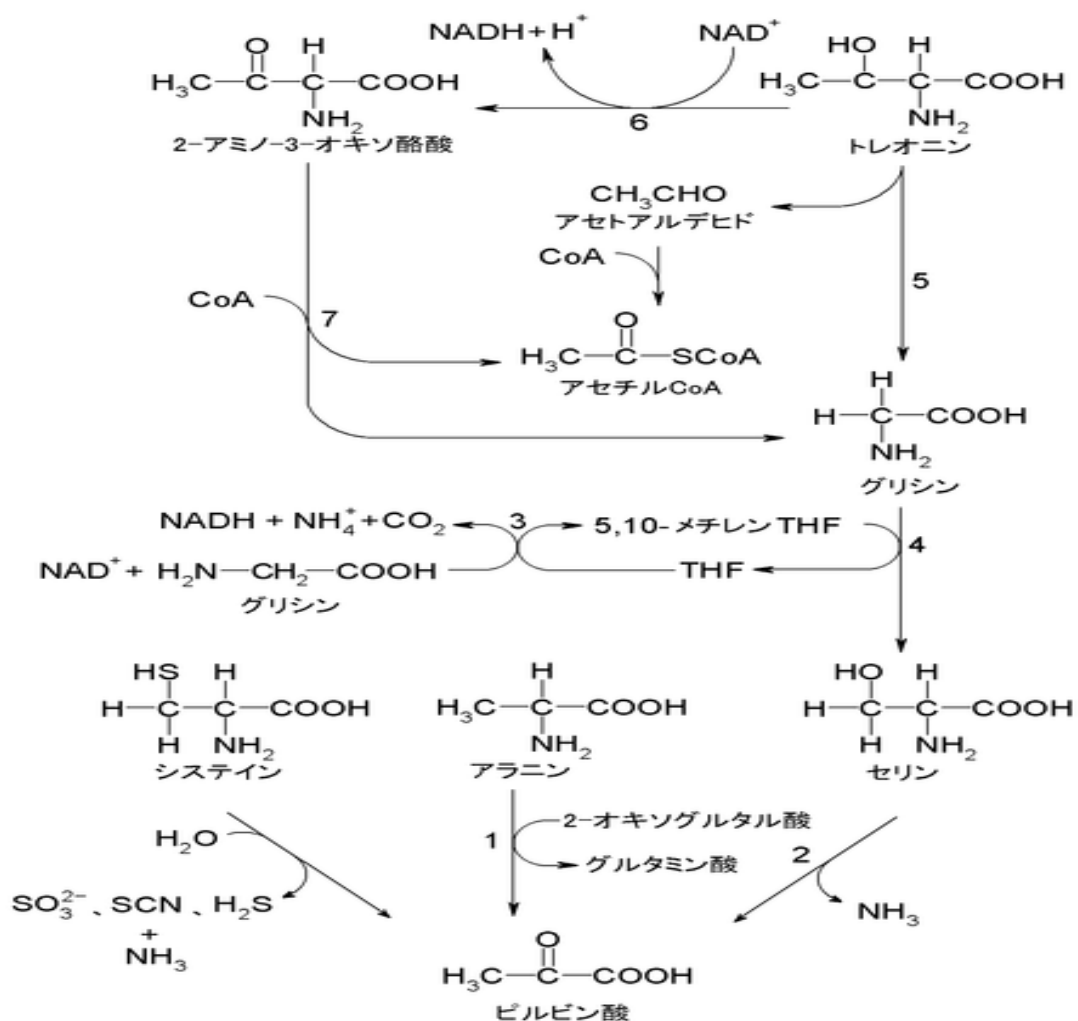


Fig.4-1-4 アミノ酸代謝分解⁴¹⁾

仮に検出された NH₃ がすべてシステインの分解によって生成されたものとして Elastin・Fibrillin の最適比率を計算すると Table.4-1-1 のようになった。システインなしで計算した値に非常に近くなっているため、この仮説もシステインの検出量が低い原因の一つであると考えられる。

Table.4-1-1 最適比率の異なる計算

No	Cys なしの計算		Cys ありの計算		NH ₃ を Cys として計算	
	Elastin (%)	Fibrillin (%)	Elastin (%)	Fibrillin (%)	Elastin (%)	Fibrillin (%)
FBN-411	9	91	21	79	12	88
FBN-412	8	92	19	81	12	88
FBN-413	12	88	22	78	14	86
FBN-414	15	85	24	76	16	84
FBN-415	22	78	31	69	23	77
FBN-416	31	69	39	61	30	70
FBN-417	35	65	42	58	35	65
FBN-418	43	57	49	51	42	58
FBN-419	61	39	65	35	58	42
FBN-4110	85	15	86	14	81	19
FBN-4111	100	0	100	0	96	4
FBN-4112	97	3	98	2	92	8

4-1-6 水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画まとめ

抽出した水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画を行うために様々な特性の測定を行い、Table.3-3-12 のようにまとめた。

Table.3-3-12 水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画における測定結果のまとめ

サンプル No	純度 (%)	弾性率 (kPa)	伸長率 (%)	膨潤度 (D/Do) ³	凝集温度 (°C)	接触角 (°)
FBN-411	91	79	121	1.88	70 以上	51.96
FBN-412	92	200	88	1.00	70 以上	47.93
FBN-413	88	284	80	1.22	70 以上	46.70
FBN-414	85	346	81	1.00	70 以上	45.11
FBN-415	78	288	64	1.00	70 以上	42.89
FBN-416	69	334	84	0.86	62.8	39.22
FBN-417	65	171	121	1.15	60.0	40.81
FBN-418	57	103	60	1.48	46.5	39.78
FBN-419	39	96	177	1.00	41.4	43.07
FBN-4110	15	61	94	2.15	39.2	43.07
FBN-4111	0	51	63	1.81	39.9	42.74
FBN-4112	3	66	76	1.52	55.7	41.93

測定値を見ると、シュウ酸処理回数の差により純度・弾性率・凝集温度の 3 点で大きな差が見られている。純度では FBN-411～415・FBN-416～418・FBN-419～4112 の 3 ブロック、弾性率では FBN-412～416・FBN-417～418、FBN-419～4112 の 3 ブロック、凝集温度では FBN-411～FBN-415、FBN-416～418、FBN-419～4111 の 3 ブロックで傾向が異なっていたため、水溶性 Fibrillin を 3 種類のアイソタイプに分画できると考えた。Fibrillin の純度の値の変化と弾性率・凝集温度の値の変化の傾向は似ていたため、弾性率と凝集温度の両方の値が Table.3-3-13 のようになる水溶性 Fibrillin を「Fibrillin-X」、「Fibrillin-Y」、「Fibrillin-Z」と定義した。

Table.3-3-13 弾性率と凝集温度による水溶性 Fibrillin のアイソタイプ分画

クラス	X	Y	Z
弾性率 (kPa)	200 以上	200-100	100 以下
凝集温度 (°C)	70 以上	70-45	45 以下

また、弾性率と凝集温度の両方の値が Table.3-14 の分画基準に合わないものは「Fibrillin-XX」、「Fibrillin-YY」、「Fibrillin-ZZ」としてアイソタイプ分画の定義に合わない水溶性 Fibrillin であるとし、実験には使用しないことにした。

アイソタイプ分画によって分画した「Fibrillin-X」は Fibrillin 純度が高く、高い力学的強度を持つため、生体内に存在している Fibrillin をほぼそのままの形で抽出できたと考えられる。Fibrillin と同じ細胞外マトリックスである Collagen はバイオマテリアルとして臨床でされるほど研究が進んでおり、Elastin についても本研究室 3 次元細胞足場材料として使用するために研究を進めている。しかし、Fibrillin に関しては材料化の研究は進んでおらず、今回抽出した水溶性 Fibrillin のように Fibrillin 単独でハイドロゲルを作製するなど材料化した文献は見つけることができなかった。

よって、今回抽出した水溶性 Fibrillin は高純度の Fibrillin 材料として非常に新規性のある材料であると考えられる。

生体内では Fibrillin のみからなるオキシタラン線維、Fibrillin と少量の Elastin からなるエラウニン線維、少量の Fibrillin と多量の Elastin からなる弾性線維の 3 種類が弾性系線維として存在していると知られている。「Fibrillin-X」、「Fibrillin-Y」、「Fibrillin-Z」も純度と特性が異なっている。それぞれ弾性系線維の 3 種類に状態が似ているのではないかと考えられ、「Fibrillin-X」はオキシタラン線維、「Fibrillin-Y」はエラウニン線維、「Fibrillin-Z」は弾性線維のような状態となっているのではないかと考えられる。

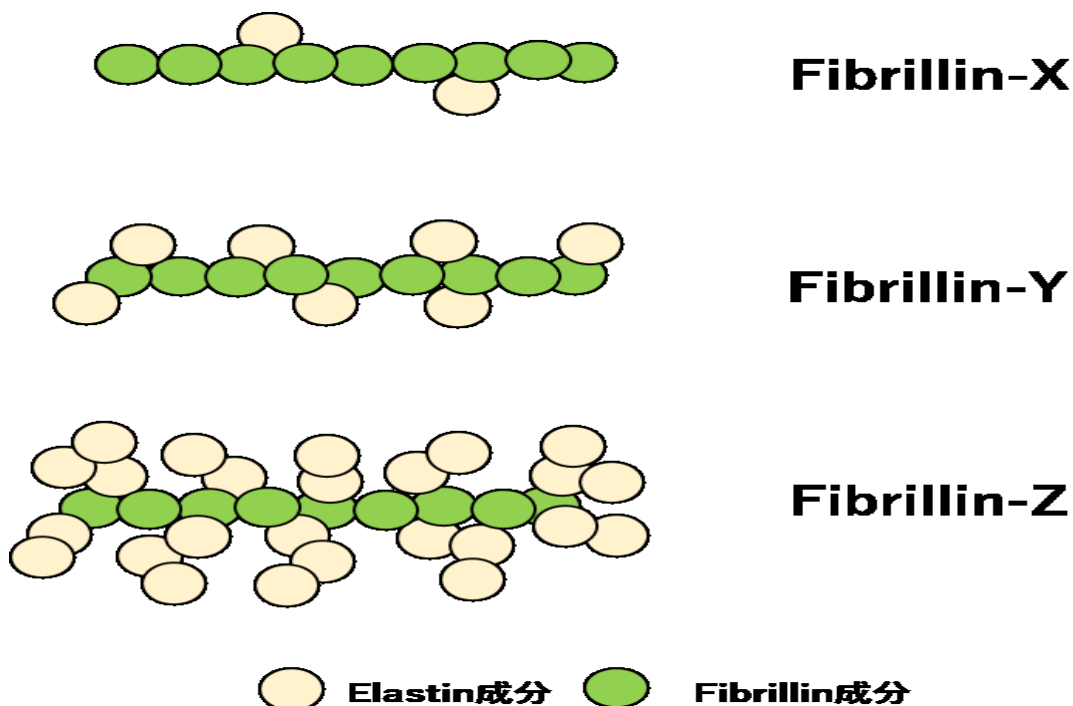
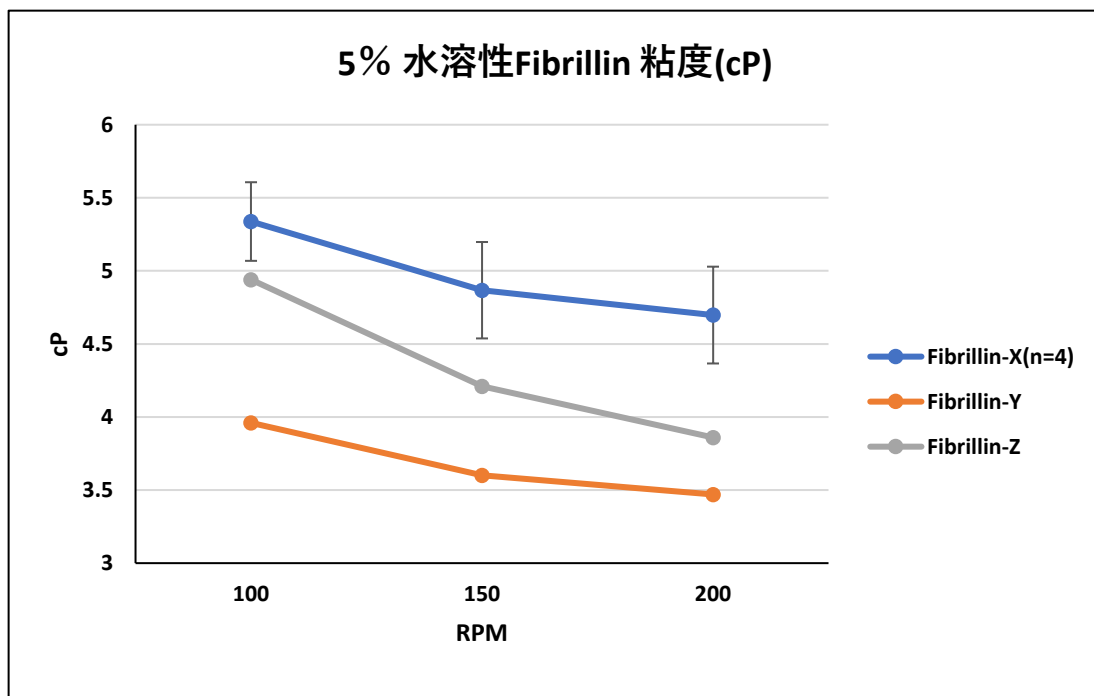
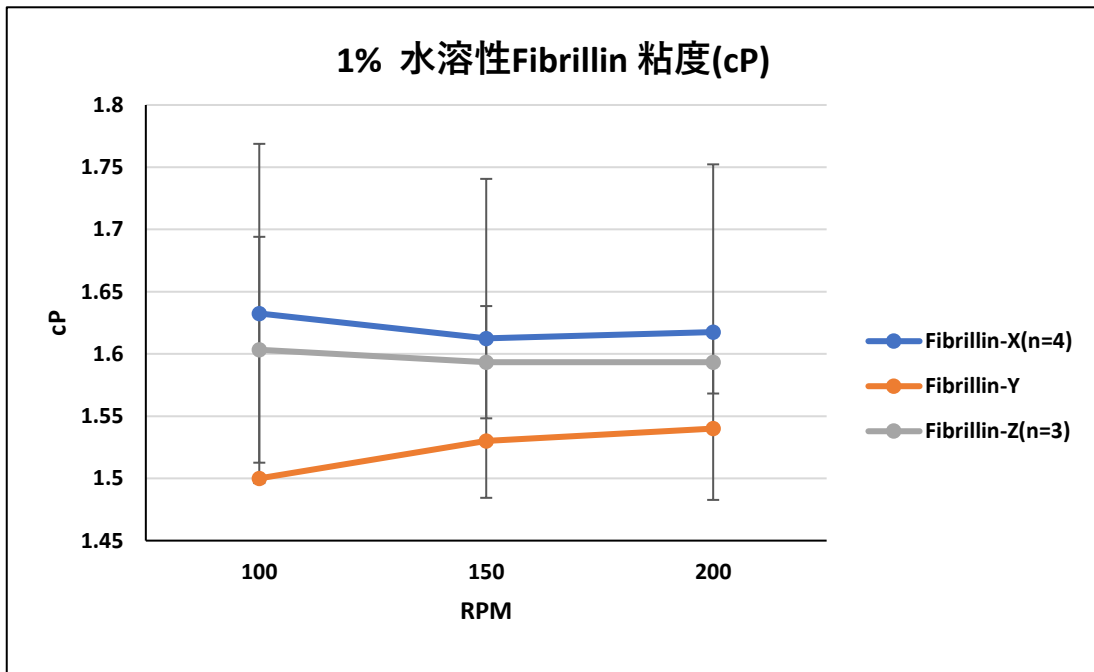


Fig.4-1-5 Fibrillin-X, Fibrillin-Y, Fibrillin-Z の状態推測

水溶性 Fibrillin の粘度測定の結果をアイソタイプ分画した Fibrillin-X、Fibrillin-Y、Fibrillin-Z の分画基準に合うもののみで比較したグラフを Fig.4-1-6 に示した。



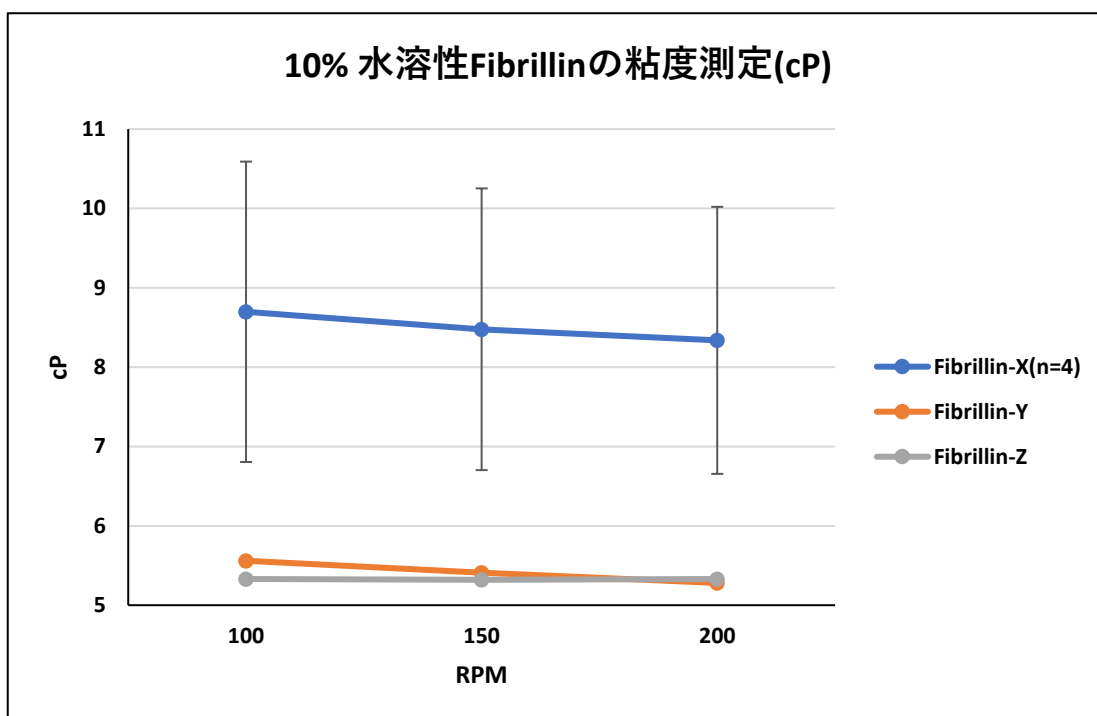


Fig.4-1-6 アイソタイプ別の水溶性 Fibrillin の粘度

1%, 5%, 10%と溶液の濃度を高くしても Fibrillin-X>Fibrillin-Z>Fibrillin-Y という粘度の高さの潤になっていた。Fibrillin-Y, Fibrillin-Z の順番に関しては n 数が不足しているため不確かであるが、Fibrillin-X がこの 3 種類の水溶性 Fibrillin 中で最も粘度が高いことは確かであると思われる。また、タンパクの濃度を高くすると粘度は上昇していたため、ゲルを作製する際に、混合比率を変化させることによりゲルの粘度を制御することが可能であると思われる。粘度を高くすることで水分の多い生体内にもインジェクトしても流れにくく生体内にとどまり続けるインジェクタブルなゲルを開発することが可能であると思われる。

4-2 加速剤のゲル化時間・弾性率・伸長率への影響

低温架橋によって Elastin Gel を作製するために加速剤として炭酸ナトリウム水溶液を混合している。加速剤濃度を高くすることでゲル化時間を早めることが測定できた。本研究室の以前までの研究結果からゲルに混合させる加速剤濃度は 80mM までなら影響が少ないということが分かっている。¹³⁾ そこで Fig.3-24 のように 30mM から 80mM までの範囲で 10mM ずつ濃度を変化しゲル化時間を測定したが、濃度が変わるとゲル化時間が大きく変化する点が数か所あった。これは加速剤を入れることによって pH の変化量が大きくなったからであると考えられる。

炭酸ナトリウム水溶液は塩基性であるため加速剤を入れることによって Elastin Gel は塩基よりなっている。Elastin はシュウ酸処理後透析している。pH が 4.5 以上になった時に上澄みを凍結乾燥している。そのため Elastin は酸性よりなっている。加速剤濃度を高めることで pH が塩基性に近づきゲル化時間は短くなっていると思われる。pH の変化が大きいところがゲル化時間が大きく変化する点と一致するのではないかと考えられる。

今回測定したゲル化時間では加速剤濃度 30mM から 50mM の間でゲル化時間が大きく変化した。加速剤濃度 60mM から 80mM の間でゲル化時間の変化は小さかった。以前の研究より加速剤濃度 20mM Elastin Gel の pH は 6.71、40mM の pH は 6.90、60mM の pH は 7.23、80mM Elastin の pH は 7.40 であるということが分かっている。この結果より 20mM から 60mM の間で pH は 0.52 変化し、60mM から 80mM の間で pH は 0.17 変化したということになる。このことにより pH の変化がゲル化時間に関与していることが示唆された。

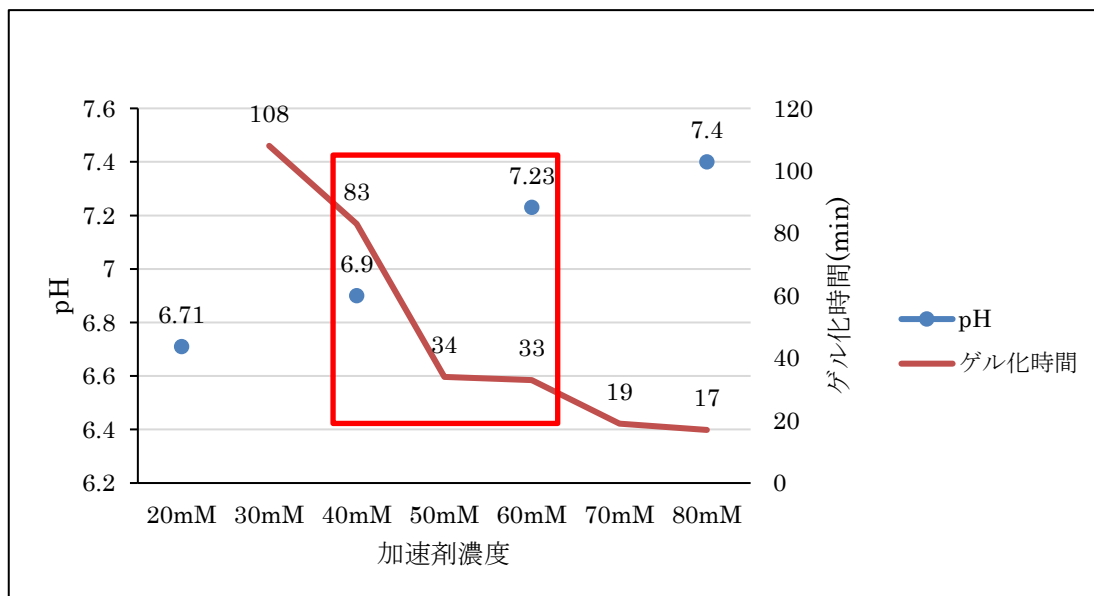


Fig.4-2-1 pH とゲル化時間の関係

低温架橋 Elastin Gel の弾性率と伸長率に関しても加速剤濃度を高くすることで変化が見られた。加速剤濃度を高くすることで弾性率は上昇するが逆に伸長率は低下していた。(Fig.3-23)

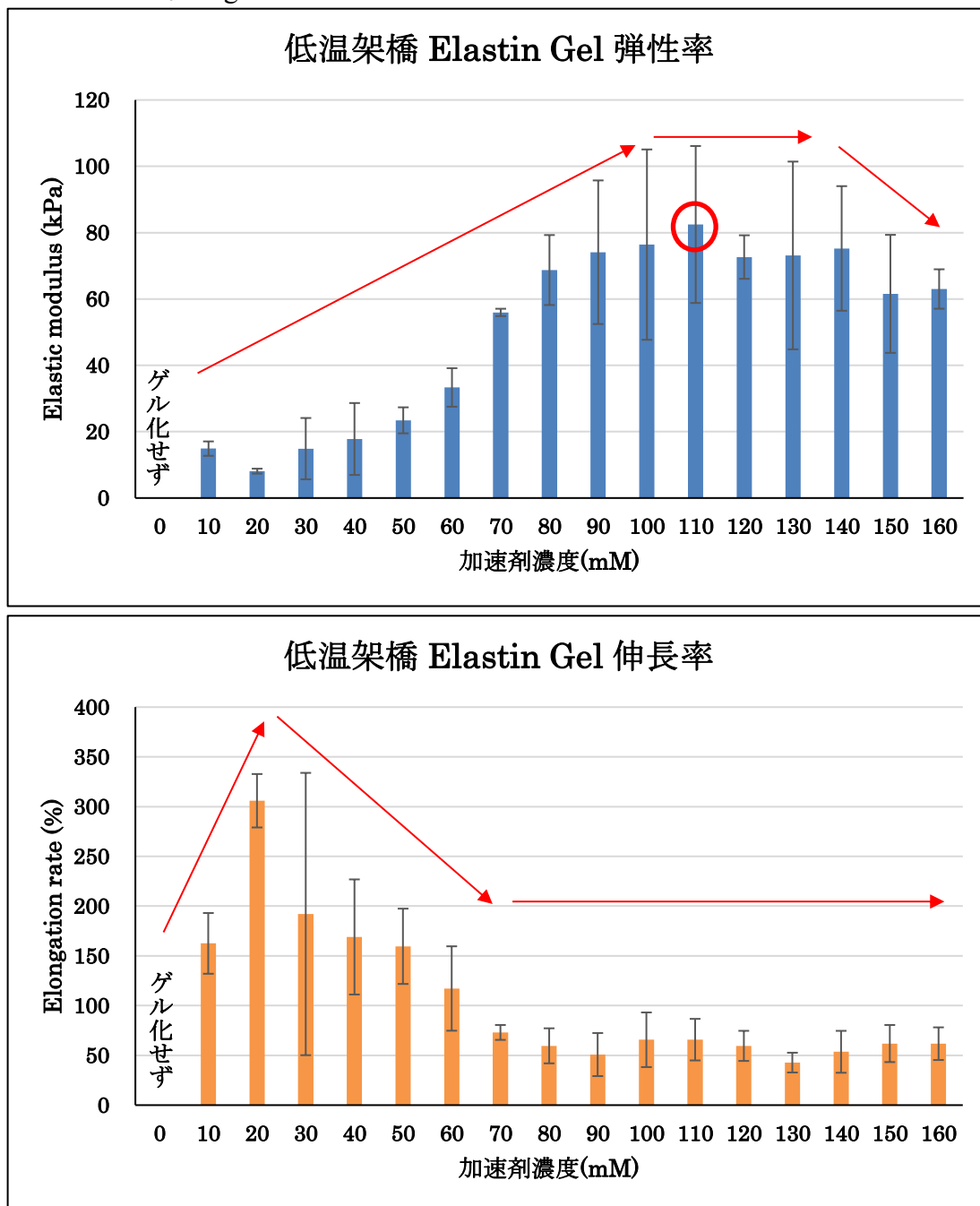


Fig.3-4-1 加速剤濃度別 Elastin Gel の弾性率・伸長率

そして、加速剤濃度がある濃度以上になると弾性率の上昇が止まり若干減少した。弾性率が最高値をとるときが Elastin と加速剤のバランスが一番取れている時であると考えられる。

4-3 Elastin Gel 内の貫通孔の形状

共焦点レーザー顕微鏡の Z-Stack 機能を用いて Elastin Gel の 3 次元画像を撮影した。(Fig.3-29~38) 各 3 次元画像の断面を見ると、ElastinA のみのゲルは貫通孔が確認できなかった。一方、ElastinE を混合させたゲルは Z 軸方向に蛍光していない線がつながっていることから、貫通孔が形成されていることが確認できた。2 次元画像では ElastinE が除去されてできた孔は全体に散らばっていることが分かる。(Fig.3-30~38) 3 次元の断面図画像より、貫通孔は直線的につながっているわけではない。孔はゲルの内部において曲がりくねり、つながっている連続孔となっている可能性が高いと考えられ、ゲル内の孔には貫通していないものもあると考えられる。

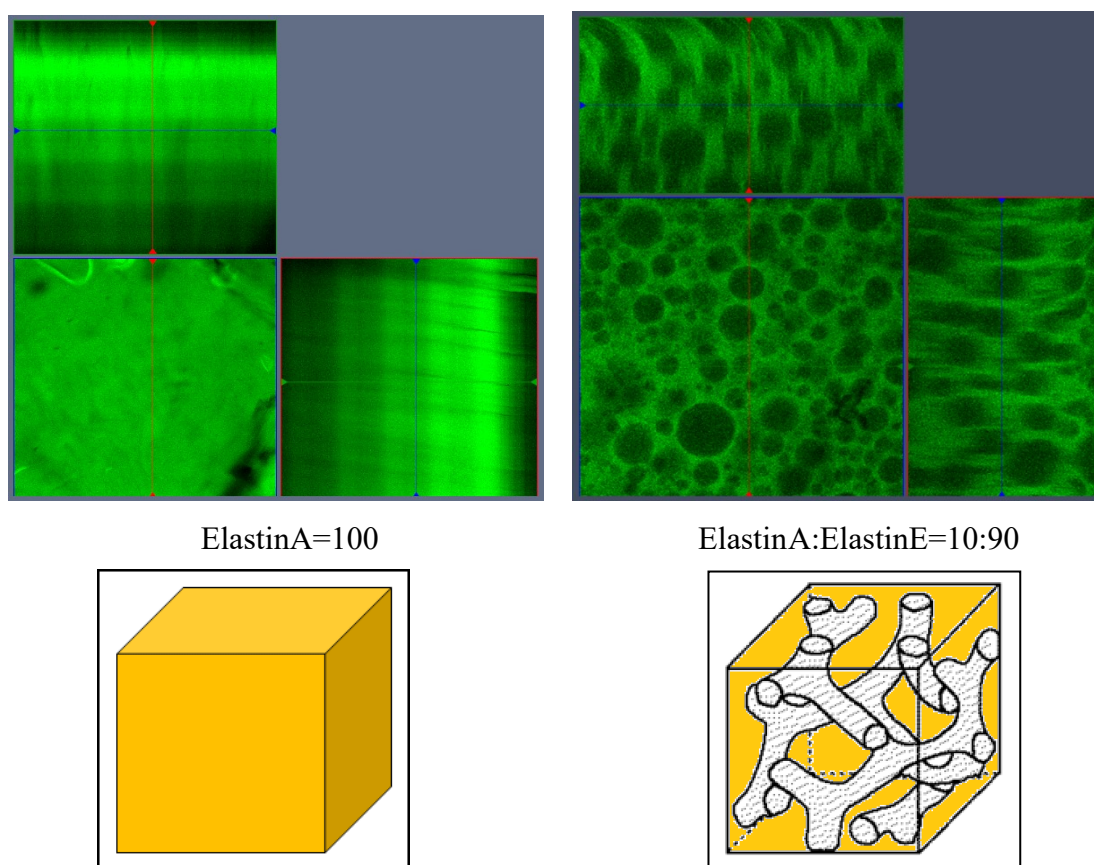


Fig.4-3-1 Elastin Gel 内の貫通孔の形状

また各混合比率の 2 次元画像から平均孔径と空隙率を算出したところ、ElastinE が高くなるにつれて、平均孔径と空隙率のどちらも高くなっていった。(Fig.3-39, 41) そのため、ElastinE の混合比率を変化させることによって平均孔径と空隙率を制御することが可能であると考えられる。

AE Gel は ElastinA と ElastinE の混合比率によって平均孔径が変化することが分かった。AE Gel を作製し脱イオン水で洗浄した後、自家蛍光により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。撮影時に輝度を変化させる Gain(Master)の値を 50 刻みで変化させそれぞれ画像を撮影した。撮影後画像解析ソフト「ZEN」を立ち上げ、画像のヒストグラムで表示される算術平均輝度を記録していった。(Fig.3-40)

その結果、各 AE Gel で ElastinA の含有率が高いほど線形近似曲線の傾きが大きくなる傾向であった。これは ElastinE が洗浄されて排出されるため、ElastinA の割合が高いほど自家蛍光する成分が多く残っているからであると考えられる。解析結果より、輝度と AE Gel における ElastinA の含有率の検量線を作成したところ、 $R^2 = 0.9814$ と非常に高い相関を示した。

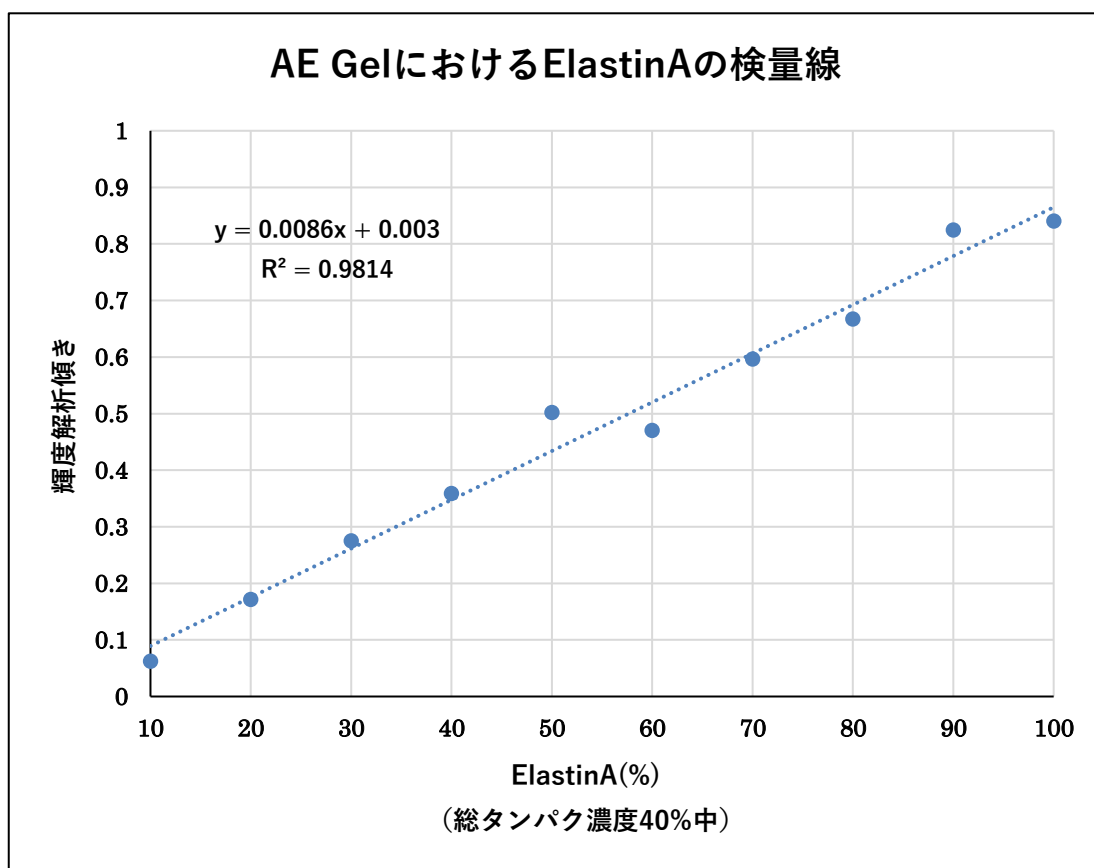


Fig.3-5-16 ElastinA+ElastinE Gel の輝度解析と検量線

この結果を用いて AE Gel の空隙率を求め、ImageJ での空隙率の解析結果と比較した。その結果、2 つの空隙率の解析結果には $R^2 = 0.936$ と高い相関があった。そのため、ImageJ と輝度変化によるこの検量線を用いた空隙率のどちらを用いてもおおよその空隙率の解析は可能であると考えられる。

4-4 ElastinE 複合ゲルの貫通孔形成

ElastinA+ElastinE Gel では ElastinE のゲル化しない特性を利用して貫通孔の作製に成功した。それに伴って、力学的強度に関しても ElastinE の割合が高くなるほど弾性率は減少し、伸長率は上昇するという結果となり、膨潤度も高くなっていた。生体温度の 37°C 付近では ElastinA は凝集するが ElastinE は凝集しにくいという特性を持っている。そのため、ゲル内でマイクロな相分離が引き起こされていると考えられる。以前までの結果より、ElastinA よりも ElastinE の方が親水性アミノ酸であるリシン、アスパラギン・アスパラギン酸、グルタミン・グルタミン酸などが多いことが分かっている。²⁴⁾

Table.4-4-1 水溶性 Elastin のアミノ酸組成²⁴⁾

数平均分子量		アミノ酸組成				
	数平均分子量 kDa	mol%	A	C	D	E
		G	32.6	33.7	33.0	31.4
A	25.2	A	28.8	26.0	27.2	18.4
B	21.4	V	12.8	15.1	14.7	13.8
C	18.7	P	4.3	4.8	4.8	5.7
D	10.3	F	3.3	3.3	3.1	3.2
E	10.1	L	6.4	6.1	6.0	6.0
		I	1.7	1.8	1.7	2.3
		S	1.4	1.2	1.3	2.4
		T	1.7	1.5	1.5	2.3
		Y	2.6	1.8	2.0	1.5
		K	0.7	0.8	0.8	2.3
		R	0.6	0.6	0.6	1.8
		DN	0.3	0.6	0.5	2.6
		EQ	2.6	2.4	2.5	5.1
		H	0.2	0.3	0.3	1.0
		C	0.0	0.0	0.0	0.0
		M	0.0	0.0	0.0	0.3
		HyP	0.0	0.0	0.0	0.0

G:グリシン A:アラニン V:バリン P:プロリン F:フェニルアラニン
 L:ロイシン I:イソロイシン S:セリン T:スレオニン Y:チロシン
 K:リシン R:アルギニン D:アスパラギン酸 N:アスパラギン E:グルタミン酸
 Q:グルタミン H:ヒスチジン C:システイン M:メチオニン HyP:ヒドロキシプロリン

疎水性アミノ酸の多い ElastinA は疎水性架橋剤 Dode-DSP と架橋するが、親水性アミノ酸が多い ElastinE は架橋しにくいと考えられる。よって、架橋されなかった ElastinE はその親水性特性のため、溶媒の水によりゲル外へ除去されるため貫通孔が形成されると考えられる。

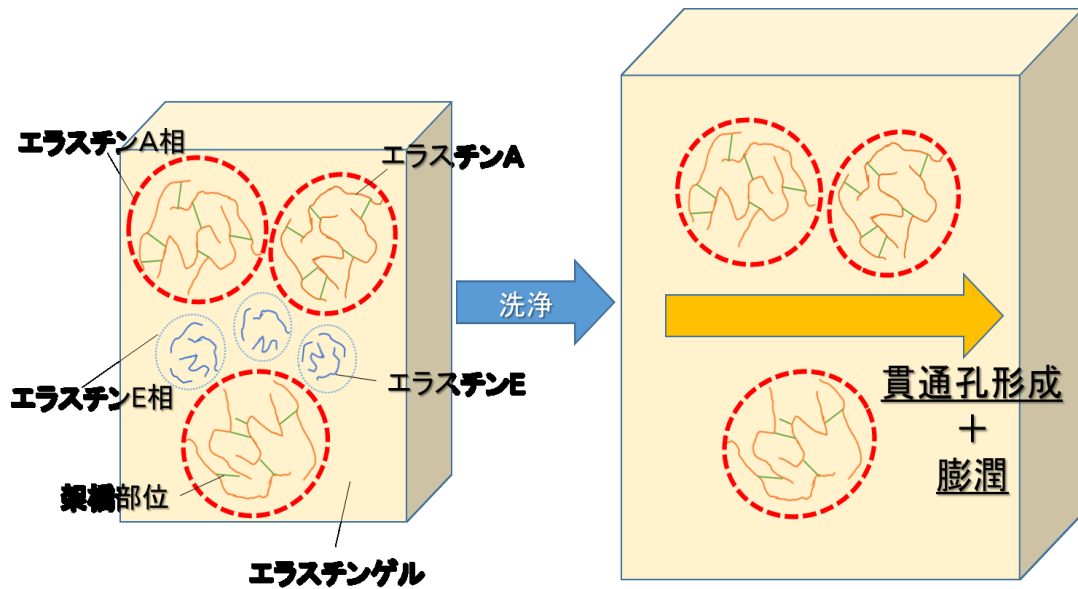


Fig.4-4-1 ElastinE 複合ゲルの貫通孔形成

共焦点レーザー顕微鏡での画像を見ると、ElastinA + ElastinE Gel は真円度の高い孔ができているのに対して、Fibrillin-X が複合された Gel は不規則な形状をした孔ができていることが分かる。(Fig.4-4-2)

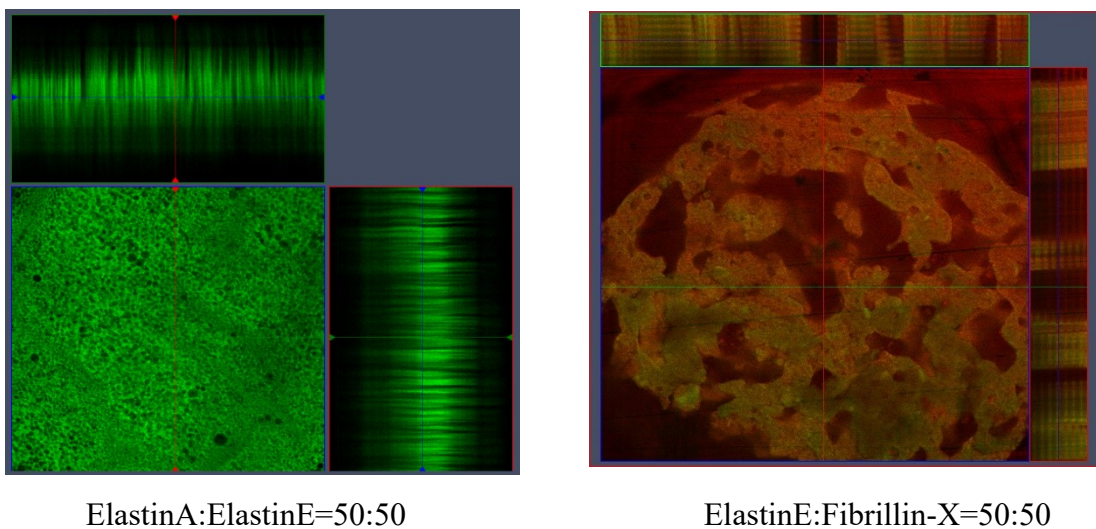
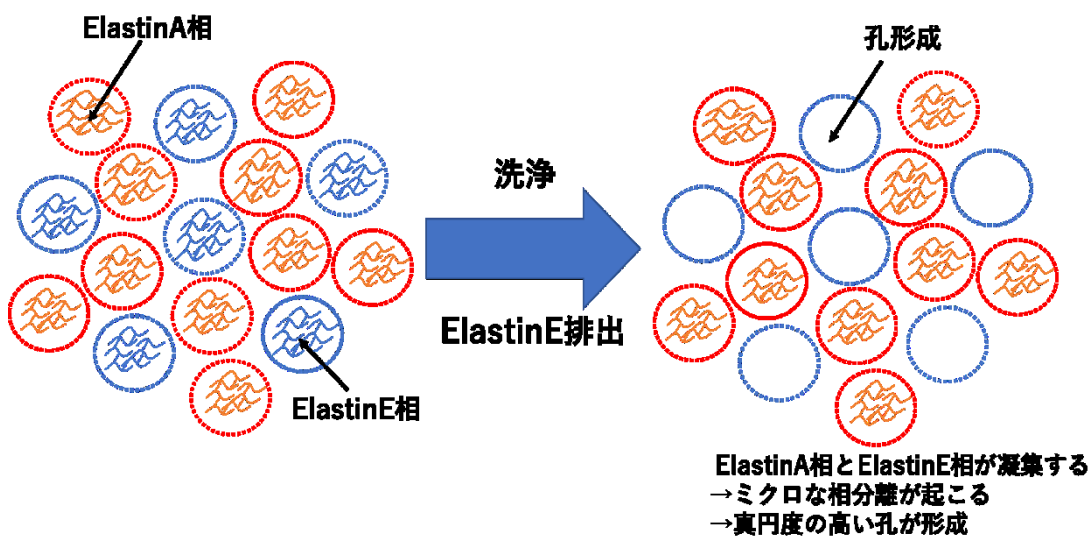


Fig.4-4-2 AE Gel と EX Gel の貫通孔構造

ElastinA の凝集温度は 22.5°C以下、ElastinE は 35~50°C (今回用いた ElastinE は生体温度付近で凝集する) であるのに対して、Fibrillin-X は 70°Cになっても凝集しない。ゲル作製時は 37°Cでインキュベートしているため ElastinA + ElastinE Gel は 2 つの成分がそれぞれ凝集することができる。しかし、ElastinE + Fibrillin-X Gel や ElastinA + ElastinE + Fibrillin-X Gel は 37°Cで凝集する成分と凝集しない成分が混合しているため、不規則な形状の孔になったと思われる。

AE Gel



EX Gel

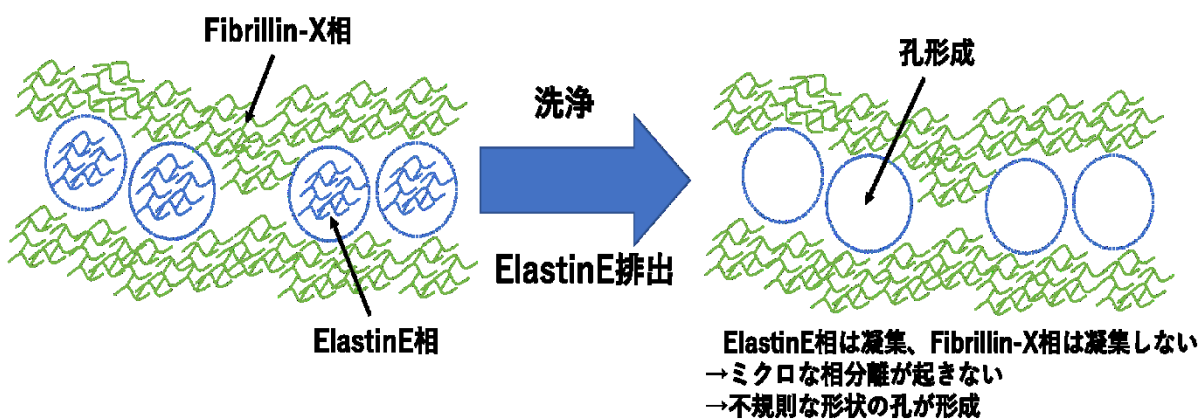
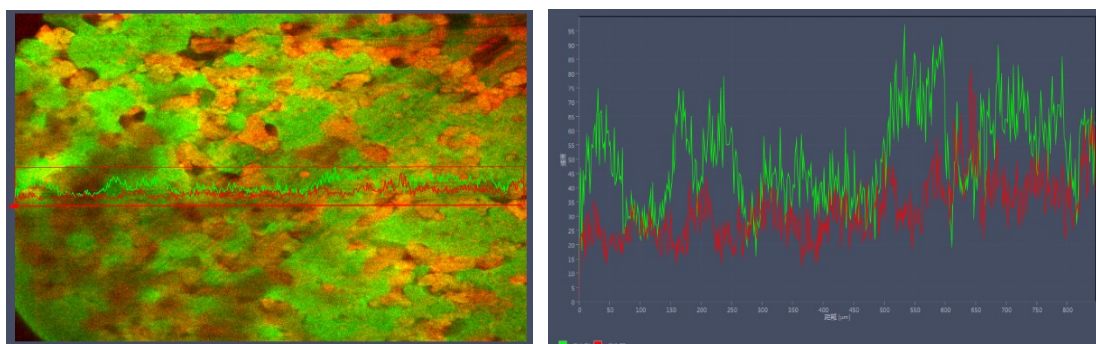


Fig4-4-3 AE Gel と EX Gel の孔形成の違い

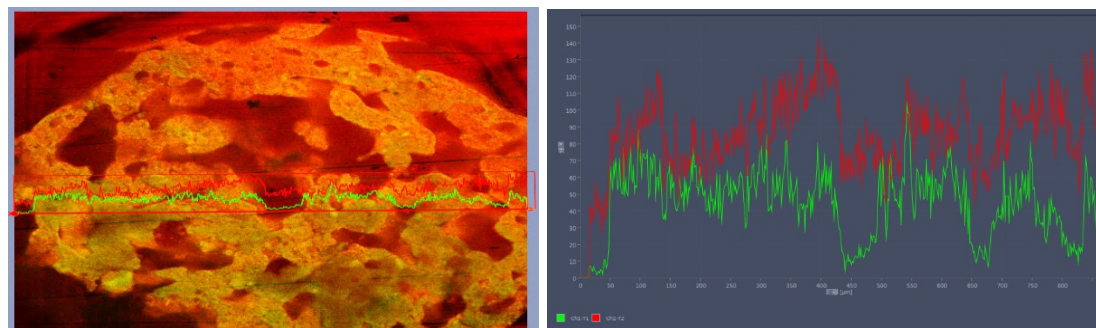
4-5 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の構造

AX Gel では Elastin と Fibrillin の輝度のピークは反比例の関係になっており、Elastin と Fibrillin はゲル内に局在していると考えられる。EX Gel ゲルでは Elastin と Fibrillin の輝度のピークは比例の関係になっており、ピークが出ている2つのタンパクは同一の可能性が高く、それは Fibrillin であると考えられる。AEX Gel では AX Gel と EX Gel の両方を兼ねたようなピークとなっているため、貫通孔を持ち Elastin と Fibrillin が共局在している状態であると考えられる。

AX Gel



EX Gel



AEX Gel

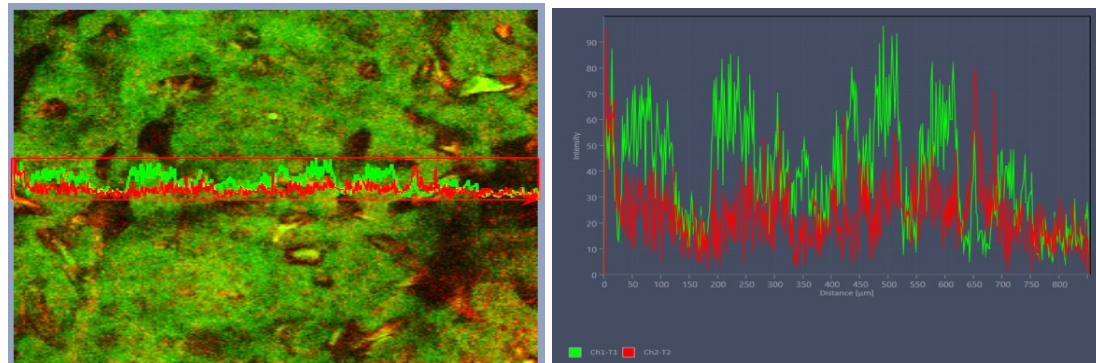


Fig.4-5-1 AX Gel と EX Gel と AEX Gel の輝度のピーク
(Green=Elastin, Red=Fibrillin)

4-6 Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の力学的特性

伸縮性に寄与する要素は Elastin、強度に寄与する要素は Fibrillin であるということが分かった。この 2 つのタンパクを複合させることにより貫通孔を持ち、伸縮性と高い強度を持つ Elastin-Fibrillin Hybrid Gel を開発することが本研究の目標である。力学的強度測定の結果、Elastin の割合が大きいと伸長率が高く、Fibrillin の割合が大きいと弾性率が高くなっていったため、2 つのタンパクの複合比率を変化させることにより弾性率と伸長率の値を制御することが可能であることが分かった。(Fig.3-44) また、Fibrillin の力学的強度を高めるために高濃度の Dode-DSP を添加することが有効であるとわかった。低濃度で Dode-DSP を添加したゲルは非常に膨潤度が高かった。(Fig.3-8) しかし、高濃度で Dode-DSP を添加したゲルは膨潤しにくくなっていた。(Fig.3-48) Fibrillin に含まれるアミノ酸のアミノ基量は Elastin の 12.5 倍であるとされている。そのため、架橋に必要な Dode-DSP の量が Fibrillin と Elastin では大きく異なることが考えられる。そのため、低濃度 Dode-DSP ではゲル内で十分な架橋が起こらなかったため膨潤が大きく、高濃度 Dode-DSP では Fibrillin のアミノ基を架橋するために十分な量が添加されたため、膨潤しにくく力学的強度の高いゲルとなったと考えられる。

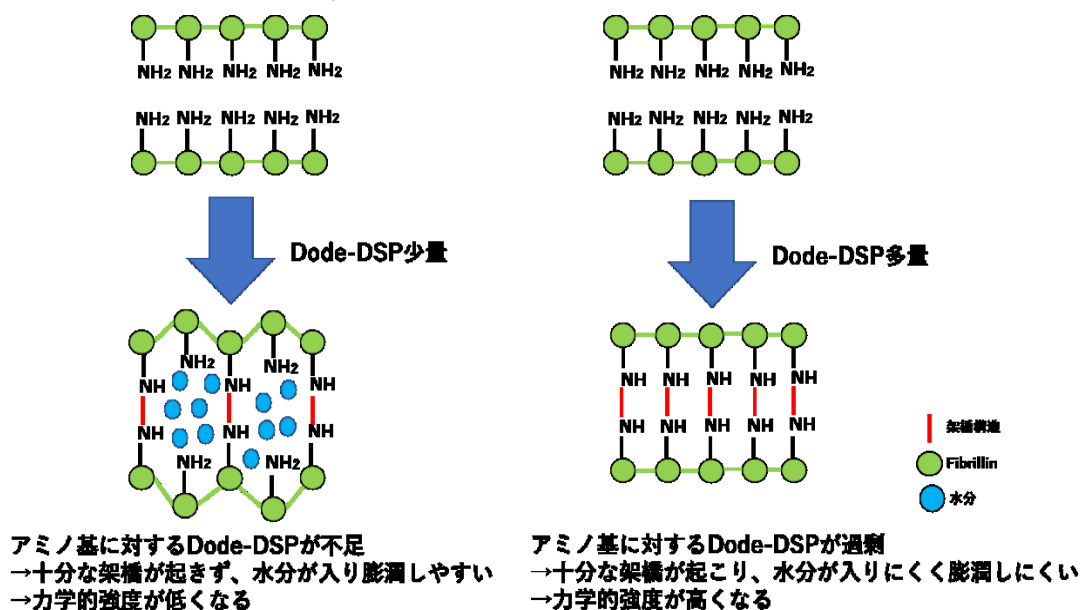
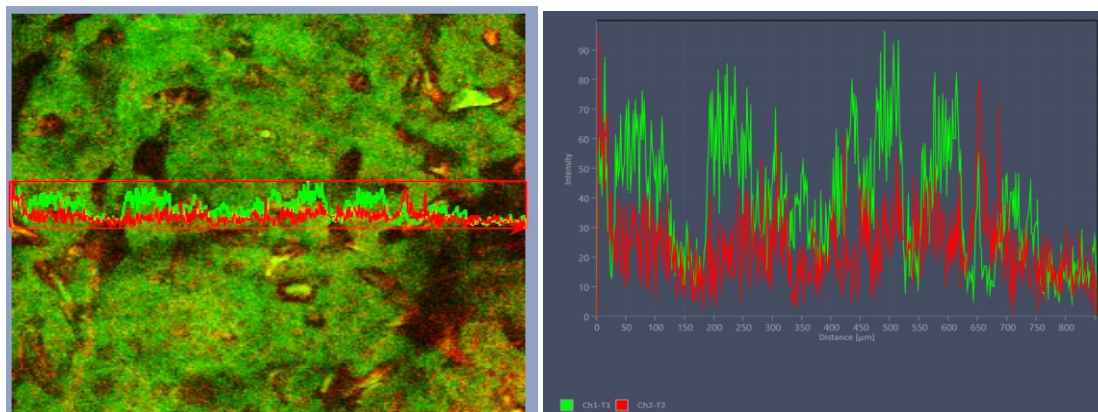


Fig.4-6-1 架橋剤 Dode-DSP の添加量による Fibrillin の架橋構造の差

AX:E=70:30、A:X=80:20 の Hybrid Gel を低濃度と高濃度の Dode-DSP を添加して作製し比較を行った。

Low Dode-DSP



High Dode-DSP

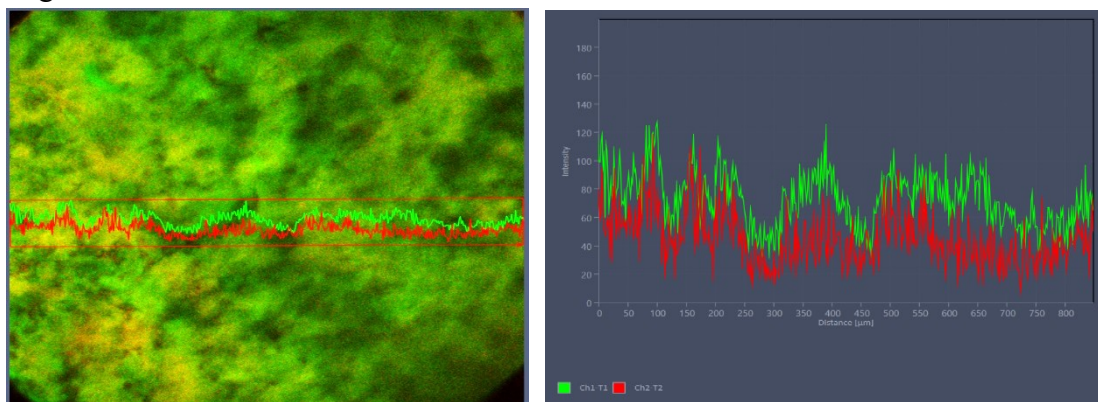


Fig.4-6-2 異なる Dode-DSP 濃度で作製した AEX Gel の構造
(Green=Elastin, Red=Fibrillin)

Low Dode-DSP と High Dode-DSP のゲルでは同じ混合比率でも構造が異なっていることが分かる。輝度のピークを見ても High の方が Elastin と Fibrillin のピークの差が小さくなっていることから、High の方が架橋が進んでいることが考えられ、上記した仮説は正しいと考えられる。(Fig.4-6-2) また、ElastinE を複合させることで貫通孔を形成しているが、明らかに Low の方が大きな孔が形成されていることが分かる。よって架橋剤 Dode-DSP の添加量によって孔の大きさを制御することが可能であると考えられる。

ElastinE を混合することで貫通孔を形成できるとともに、伸長率を上昇させることが分かった。本研究で作製した貫通孔を持つ Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の中で弾性率と伸長率のバランスが最もとれている混合比率は AX:E=70:30, A:X=80:20 であると考えた。この混合比率を基準の 3 次元細胞培養足場材料として、力学的強度の値を変化させることでバイオメカニクスの異なる様々な弾性線維組織を再生させるための 3 次元細胞足場材料を容易に作製することができるのではないかと考える。

4-7 後付け架橋によるゲルの力学的強度の上昇

作製した Elastin-Fibrillin Hybrid Gel を架橋剤 Dode-DSP 水溶液に浸すことでゲルの力学的強度が上昇した。(Fig.3-51) この現象は低濃度 Dode-DSP (Elastin での架橋倍率 2 倍[53.77mM]) で作製したゲルと高濃度 Dode-DSP (Fibrillin での架橋倍率 1 倍[336.25mM]) でも起こった。このことよりゲル作製時に混合した架橋剤だけでなく、後から添加した架橋剤もゲルに反応し、架橋を進めることができると考えた。(後付け架橋) この仮説を確かめるために、ゲルを 1 日と 7 日浸した後の Dode-DSP 水溶液を回収し凍結乾燥を行った。凍結乾燥後のサンプルを NMR によって測定した。本研究で使用している架橋剤 Dode-DSP は Fig.4 に示す構造をしており、架橋が起こると主鎖部分である「Dodecane dicarboxylic acid」部分がゲル中の Elastin と Fibrillin のアミノ基同士を結合し、架橋反応が起こった後は、端部分の「DSP」部分が外れるという反応が起こる。

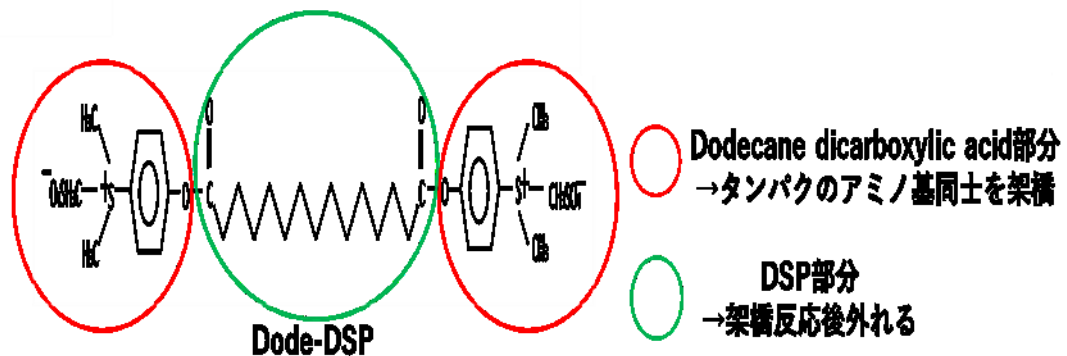


Fig.4-7-1 Dode-DSP による架橋反応

NMR によって測定したところ、1 日目よりも 7 日目の方が Dode-DSP のピークが小さくなり、DSP のピークが大きくなっていた。(Fig.3-54, 55) このことから、後付け架橋は起こっていることが確認できた。また、1mM、5mM、10mM、50mM と異なる Dode-DSP 水溶液にゲルを浸したが、1mM は 7 日後には Dode-DSP のピークはほとんどなくなっており、水溶液中の Dode-DSP のほとんどが架橋に使用されたということが分かる。また、30mM、50mM はまだ、Dode-DSP のピークが確認できるため 7 日で架橋に使用されるには過剰量であったことが言える。また、30mM よりも 50mM の方が弾性率が減少しているゲルもあったため、高濃度になると濃度依存性ではなくなっていた。そのため、添加する濃度は 10mM 以下の濃度でも十分であることが考えられる。

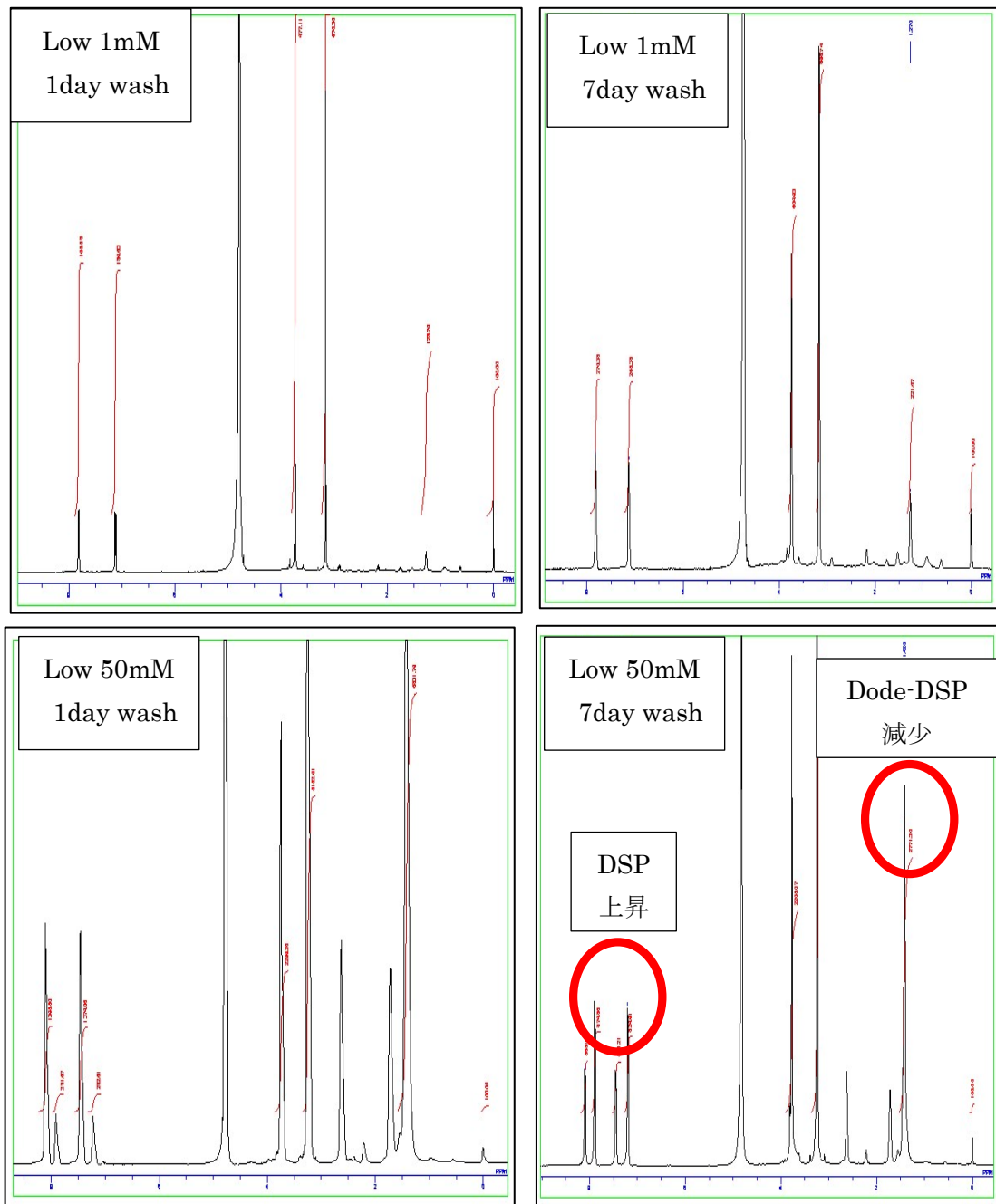


Fig.4-7-2 Low Dode-DSP ゲルの 1mm と 50mM の NMR 比較

また、低濃度 Dode-DSP (Elastin での架橋倍率 2 倍[53.77mM]) で作製したゲルと高濃度 Dode-DSP (Fibrillin での架橋倍率 1 倍[336.25mM]) を 1 日と 7 日脱イオン水に浸すと高濃度 Dode-DSP で作製したゲルは力学的強度が上昇したが低濃度 Dode-DSP で作製したゲルは減少した。この結果も NMR によって測定したところ、低濃度ゲルは 7 日目にエラスチンと思われるピークが検出されたが、高濃度ゲルは検出されなかった。そのため、低濃度ゲルは架橋が弱いため早く分解されたと思われる。しかし、高温架橋ゲルは分解が遅く、脱イオン水に浸したとしても架橋剤成分が流出しにくいということが分かった。

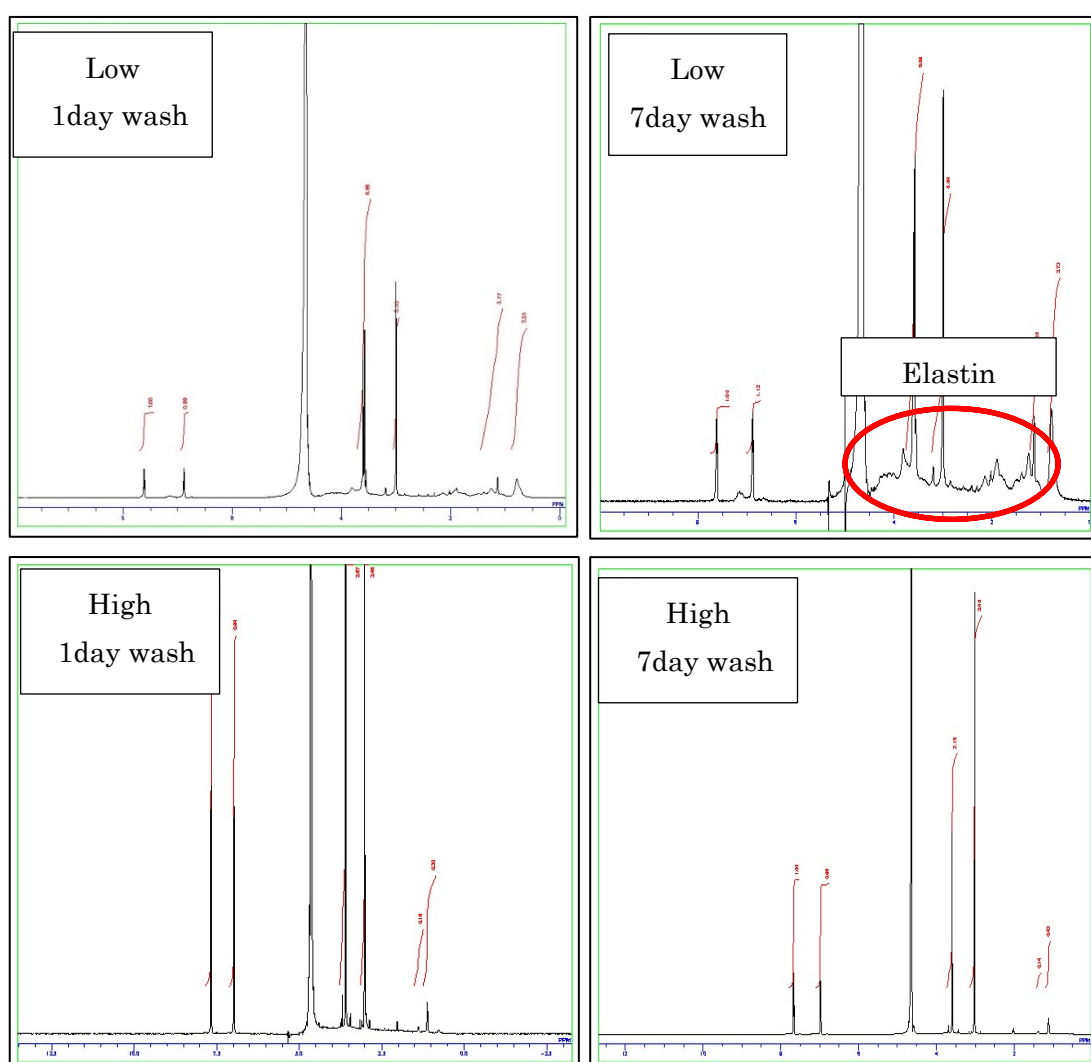


Fig.4-7-3 Low・High Dode-DSP ゲルの 1 日と 7 日洗浄後の NMR 比較

架橋剤 Dode-DSP 水溶液および Dode-DSP 添加 DMEM にゲルを浸すことによって Hybrid Gel の力学的強度を上昇させることができた。(Fig.3-51, 55, 56, 60) 細胞包埋ゲルを作製後 Dode-DSP 添加 DMEM で培養することにより、3次元培養を行いながらゲルの力学的強度を上昇させることができると考えている。この方法を行う前に Dode-DSP と DSP の細胞に対する毒性試験を確かめる必要があると考え、3-9 で毒性試験を行った。トリパンプルー染色を行った結果、Control と比較すると Dode-DSP、DSP の濃度が高くなっても死細胞率に大きな変化は見られなかった。(Fig.3-67, 69) そのため、Dode-DSP、DSP による細胞毒性は少ないことが考えられる。よって、Fig.4-7-4 のような方法で細胞包埋ゲルの力学的強度を上昇させながら培養をすることができると考えられる。

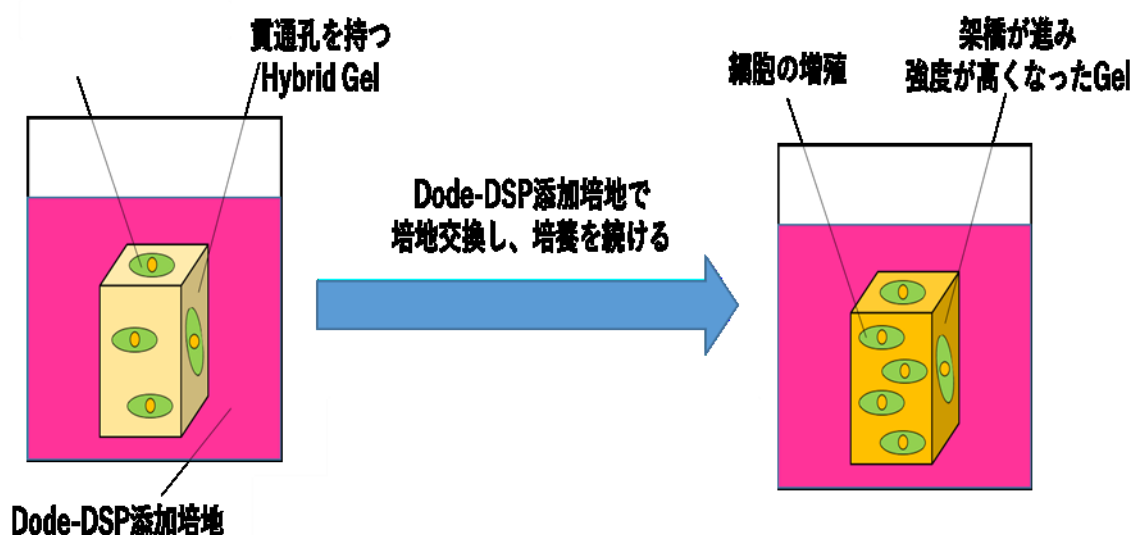


Fig.4-7-4 Dode-DSP 添加 DMEM による細胞包埋ゲルの培養方法

Dode-DSP 添加 DMEM によって細胞を培養し、細胞が基質産生し弾性線維を形成するまで、ゲルの力学的強度を保持し続けることが可能であると考え。ゲル内に弾性線維が形成された後は通常の DMEM で培養することによって、ゲルは加水分解と細胞が産生するエラスチンを分解するエラスターゼやマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) といった分解酵素によって分解すると考えられる。ゲル分解後は細胞がゲル内で形成した弾性線維が残るため弾性線維組織の再生ができると考える。

4-8 3 次元培養後の細胞応答

ECM コーティングシャーレ培養では、Control と比較しても遺伝子発現に大きな変化はなかった。シャーレでの 2 次元培養とゲルでの 3 次元培養を比較すると弾性線維関連遺伝子である Elastin、Fibrillin-1、Lysyl Oxidase は遺伝子発現が上昇していた。膠原線維関連遺伝子である Collagen I と筋線維芽マーカーである α SMA の遺伝子発現は減少した。このことによりゲル内で 3 次元培養することによって弾性線維関連遺伝子の発現のみを上昇させていることが分かる。シャーレでの 2 次元培養とゲルでの 3 次元培養では足場の硬さや細胞に接する基質の量が大きく異なっている。そのため、ゲル内で細胞を培養することでシャーレよりも生体内での弾性線維組織の状態に近くなるため、弾性線維関連遺伝子の発現が上昇したと考えられる。よって、今回作製した 3 次元細胞培養基材であるゲルで細胞を培養し続けることで弾性線維関連の基質産生が活発になり、最終的にはゲル内で弾性線維を形成することが可能であると考ええる。今回用いたゲルは Elastin と Fibrillin のゲルであるため弾性線維関連遺伝子のみが発現量が上昇するという結果となったが、同様に考えると Collagen 成分がゲル内に混合されることで Collagen I 遺伝子も発現が上昇するのではないかと考えられる。Elastin、Fibrillin、Collagen の 3 種類のタ細胞外マトリックスが複合された 3 次元細胞培養基材で培養することで弾性線維と膠原線維の両方の再生を行うことができることが可能になるのではないかと考える。

4-9 今後の展望

①本研究により新規性の高い Fibrillin 材料の作製に成功し、特性の異なる「Fibrillin-X」、「Fibrillin-Y」、「Fibrillin-Z」の3種類にアイソタイプ分画できた。本研究では高強度の Elastin-Fibrillin Hybrid Gel を作製することを目的としていたため、力学的強度の高い「Fibrillin-X」のみを使用した。そのため、「Fibrillin-Y」、「Fibrillin-Z」に関しての特性はあまり分かっていない。Fibrillin の純度やその他の特性から考えて、3次元細胞培養足場材料として用いると細胞応答などが異なるのではないかと考えている。そのため、今後は Fibrillin-Y と Fibrillin-Z に関する調査も必要であると思われる。

②SDS-PAGE および Western blot とゲル濾過クロマトグラフィーによって各シユウ酸回数の異なる水溶性 Fibrillin の分子量を測定し、各水溶性 Fibrillin がどのような分子量分布となっているかが分かった。他のロットナンバーの水溶性 Fibrillin に関しても同様の傾向を示すのかを測定する必要がある。

③水溶性 Fibrillin 単体での粘度を測定した結果、シユウ酸回数の異なる水溶性 Fibrillin は粘度が異なっていることが分かった。そのため水溶性 Elastin と複合させて Hybrid Gel を作製する際に扱いやすさが異なってくることが考えられる。水溶性 Elastin を複合させた際の粘度を測定する必要がある。また、架橋剤 Dode-DSP の添加量(濃度)によっても粘度は異なっていることが考えられるため、Dode-DSP の添加量による粘度の違いも測定する必要がある。プレゲル溶液を粘度を制御することで、水分の多い生体内にも注入することができ、また流れにくい特性を持つインジェクタブルなゲルを開発することも可能であると考ええる。

④ElastinA+ElastinE+Fibrillin-X Hybrid Gel (AEX Gel) は貫通孔が形成されていたが、ElastinA+ElastinE Gel (AE Gel) のように容易に平均孔径の制御することが困難であった。よって AEX Gel においても平均孔径や空隙率を容易に制御することができる作製方法を開発する必要がある。また、弾性率に関しては高い力学的強度のゲルを作製することが可能となったが、伸長率に関しては100%以下のものがほとんどであった。そのため、伸長率がより高いゲルの作製方法を開発する必要がある。力学的強度を高くするために ElastinA を使用しているが、伸長率が ElastinA よりも高い ElastinB、ElastinC、ElastinD を用いて BEX Gel、CEX Gel、DEX Gel を作製することで、伸長率を向上させることができるのではないかとと思われる。

⑤作製したゲルで細胞を 3 次元培養したところシャーレによる 2 次元培養よりも弾性線維関連遺伝子の発現量の上昇が見られた。そのため、弾性線維由来のタンパク質より作製した 3 次元足場材料は弾性線維の再生に有効であることが示唆された。しかし、mRNA レベルの上昇であり、実際にタンパク質となり基質産生が行われているかは確認できていない。そのため、Western blot を行うなどによって産生したタンパク量を定量する必要がある。また、3 次元培養を行うことによって細胞の増殖能に変化が起きるのかを通常培養の結果と比較する必要がある。

⑥3 次元培養を行い足場材料内に弾性線維を形成し、弾性線維組織を再生することが最終目的である。本研究ではゲル内に弾性線維が形成されるまでを確認することはできなかった。そのため、今後は 3 次元培養を行った後、共焦点レーザー顕微鏡によって弾性線維を観察する必要がある。

⑦組織工学において組織が再生するにつれて足場材料は分解されリモデリングされる必要がある。本研究では Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の分解に関しては見ていない。エラスチンはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) やエラスターゼなどの分解酵素によって分解される。本研究で作製した Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の分解特性を見る必要がある。

⑧組織工学的人工血管を作製するにはより高い力学的強度が求められる。Elastin と Fibrillin ではこの強度には及ばない。そのため、高強度な力学的特性を持つ Collagen を用いる必要がある。しかし、Elastin と Fibrillin のように元々同じ組織・同じ線維であるタンパク質同士は相互作用しやすく容易に複合材料を作製することが可能であるが、Collagen は異なるため複合材料化が困難である。そのため、Elastin・Fibrillin・Collagen の 3 種類の細胞外マトリックスを複合化させる技術を開発する必要がある。

⑨Elastin・Collagen はエレクトロスピニング法によってファイバーシートを作製することが可能である。同様に Fibrillin でもファイバーシートが作製することが可能ではないかと考える。仮に Fibrillin ファイバーシートが作製できたならば、複合させる材料が増えるため、より幅広い材料の組み合わせが可能になると考えられる。

⑩Hydro Gel での 3 次元培養は well プレートやアシストチューブで行った。他にも直径の小さいキャピラリーチューブなど様々な型でもゲルを作製後、培養することができるかなどを確認する必要がある。

5 章.結論

- ① 純度の高い水溶性 Fibrillin の抽出に成功した。
特性の違いにより水溶液 Fibrillin を 3 種類のアイソタイプに分画することに成功した。
- ② Elastin・Fibrillin の混合比率を変化させることで力学的強度の異なる Hybrid gel の開発に成功した。
- ③ ElastinE を複合させることで Gel 内に貫通孔を作製することができ、その貫通孔構造の観察にも成功した。
- ④ 作製した Gel に細胞を包埋し、遺伝子発現を測定した結果 Dish よりも遺伝子発現が上昇することが分かった。

6 章.謝辞

本研究及び修士論文を作成するにあたって、多くのご指導、ご鞭撻を頂いた三重大学大学院 工学研究科 分子素材工学専攻 生体材料化学研究室 堀内 孝教授、宮本 啓一准教授に対し深く御礼申し上げます。堀内先生には研究に対する姿勢を教えていただき、ゼミにおいても様々なアドバイスをしてくださいました。深く感謝申し上げます。宮本先生には研究において多くのアドバイスをしていただいたとともに、実験装置の作製・修理など様々な面で研究活動を支えて下さり、深く感謝しております。エラスチンについて熱く語り合った時間は本当に大切にかけがえのない時間となりました。

本修士論文の副査を務めて頂いた三重大学大学院 工学研究科 分子素材工学専攻 分子生物工学研究室 湊元 幹太准教授にも心から感謝申し上げます。

また、研究室生活において様々なサポートをして頂いた村上 節子さんにも深く感謝申し上げます。

動物実験を行うにあたってご指導頂きました三重大学医学系研究科整形外科学の長谷川 正裕先生、海野 弘至先生、鈴木 慶亮先生、伊東 直也先生、服部 徹也先生、細井 敬先生、動物実験施設の皆様、本当にありがとうございました。

研究を進めていくにあたって、同じ「エラスチン」を研究テーマに持つ晝河 政希さん、石崎 梓さん、出口智恵さん、三田百恵さん、丹羽紘介くん、村手香奈子さん、伊藤悠貴くん、金澤友希くん、井上陽太くん、皆様本当にありがとうございました。晝河 政希さんには 3 年間エラスチングループの先輩として優しくご指導くださり感謝しています。実験で困ったことがあると、いつも親身になって考えてくださりアドバイスをしていただきました。また、組織工学的的人工靱帯の開発にも携わらせていただいたことは本当に貴重な経験となりました。心より感謝申し上げます。

同じ「弾性線維」を研究テーマに持つ村手香奈子さんには実験に関して多くのアドバイスとサポートをして頂きました。M2 から細胞を扱う実験を行うこととなり、戸惑っていましたが細胞培養をはじめ、快く引き受けてくださりました。そのおかげで実験を行うことができました。心より深く感謝しております。

最後に研究室生活において様々な面で支えて下さり、やさしくご指導頂いた先輩方、共に支えあい 3 年間で過ごした安部 将史くん、石崎 梓さん、岩本 真直くん、佐野 巧くん、日比野 裕樹くん、宮本 愛子さん、本当にありがとうございました。

そして、これまで 24 年間支えてくれた両親に深く感謝申し上げます。

平成 30 年 3 月
井上 綱太

7 章.参考文献

- 1) <https://www.jotnw.or.jp/transplant/about.html>
- 2) 室田 誠逸 再生医学・再生医療/ 東京化学同人
- 3) 田畑 泰彦 再生医療のためのバイオマテリアル/ コロナ社
- 4) 許 俊鋭 人工臓器・再生医療の最先端/ 先端医療技術研究所
- 5) 矢嶋 俊彦 et al: 歯周組織の弾性系線維. 日歯周誌, 2004;46:175-184
- 6) Tsuruga E, et al: Expression of fibrillins and tropoelastin by human gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH, 2002; 37:22-28
- 7) 大山 俊郎 弾性線維 病態生理と疾患/ 共立出版
- 8) 溝口 昌子 et al: 皮膚の辞典/ 朝倉書店
- 9) 林 紘三郎 バイオメカニクス/ コロナ社
- 10) <https://www.saravio.jp/labo/skincarecience/2/>
- 11) <http://www.saiseiken.com/column/03.html>
- 12) 日本血管生物医学会 血管生物医学事典/ 朝倉書店
- 13) 傍嶋 達也/コアセルベーションを利用した自己組織型エラスチンゲルの開発/
平成 26 年度修士論文
- 14) https://www.joa.or.jp/public/sick/condition/ligament_injury_of_th_knee.html
- 15) <http://yourbestsolution.jp/rehab-2/>
- 16) 林 紘三郎 et al: 生体細胞・組織のリモデリングのバイオメカニクス/コロナ社

- 17) 久住 眞理 et al: 心身健康科学シリーズ 人体の構造と働き/ 人間総合科学大学
- 18) 日本機械学会 バイオメカニクスシリーズ 生体力学/オーム社
- 19) https://www.qlife.jp/dictionary/anatomy/i_6
- 20) 伊藤 正裕 et al: これで分かる！ 人体解剖パーフェクト事典/ ナツメ社
- 21) <https://www.kango-roo.com/sn/k/view/1893>
- 22) <http://www.studyinukraine.eu/wp-content/uploads/2014/05/image006.png>
- 23) 池田 研二 et al: 生体物性/医用機械工学/ 秀潤社
- 24) 岡井 正典/エラスチンゲルの力学特性の制御/平成 20 年度修士論文
- 25) 神谷 歩/弾性組織再生のためのエラスチン・フィブリリン複合化材料の開発/平成 24 年度修士論文
- 26) https://www.hayashikane.co.jp/shohin/ela/ela_02.html
- 27) 傍嶋 達也/コアセルベーションを利用した自己組織型エラスチンゲルの開発/平成 26 年度修士論文
- 28) P.A. Handforda, et al: Fibrillin: from domain structure to supramolecular assembly. Matrix Biology 19 2000; 457-470
- 29) Erhard Hohenestera, et al: Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. Matrix Biology 21 2002; 115-128
- 30) Noe L. Charbonneau, et al: Fine Tuning of Growth Factor Signals Depends on Fibrillin Microfibril Networks. Birth Defects Research (Part C) 72 2004; 37-50
- 31) http://www.nitta-gelatin.co.jp/gelatin_lab/3.html

- 32) 田島 康裕/エラスチンゲルの力学特性の制御/平成 25 年度卒業論文
- 33) 後藤 彩香/エラスチン・フィブリリンハイブリッドゲルの開発/平成 26 年度卒業論文
- 34) 古菌 勉, et al: ヴィジュアルでわかるバイオマテリアル/ 秀潤社
- 35) 立石 哲也, et al: 図解 再生医療工学/ 工業調査会
- 36) Keiichi Miyamoto, et al, Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, Vol. 45, No. 1, pp. 33-41.
- 37) Consuelo P´erez-Rico, et al, Elastin Development-Associated Extracellular Matrix Constituents of Subepithelial Connective Tissue in Human Pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:6309– 6318. DOI:10.1167/iovs.14-14214
- 38) Unnikrishnan Sivan, et al, Matrix-directed differentiation of human adiposederived mesenchymal stem cells to dermal-like fibroblasts that produce extracellular matrix. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE J Tissue Eng Regen Med* 2016; 10: E546–E558.
- 39) Fumiaki Sato, et al: Lysyl Oxidase Enhances the Deposition of Tropoelastin through the Catalysis of Tropoelastin Molecules on the Cell Surface. *Biol. Pharm. Bull.* 2017; 40, 1646–1653
- 40) Lavanya Venkataraman, et al: Nanoparticulate delivery of agents for induced elastogenesis in three-dimensional collagenous matrices. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE J Tissue Eng Regen Med* 2016; 10: 1041–1056.
- 41) 田宮 信雄 訳 et al/ヴォート基礎生化学第 3 版/東京化学同人