

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03526

研究課題名(和文) 分野融合による魚鱗コラーゲンマテリアルテクノロジーに関する研究

研究課題名(英文) Research on fish scale collagen material technology by field fusion

研究代表者

生駒 俊之 (Ikoma, Toshiyuki)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：20370306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン線維の整列した材料と、コラーゲンの糖修飾、並びにコラーゲン線維の配向した細胞外マトリックスの形成要因を明らかにすることを目的として、電気化学反応によるコラーゲンと水酸アパタイトの傾斜材料の創出並びにチオールエン反応を用いたグリコシル化コラーゲンの創出に成功した。グリコシル化することにより、線維芽細胞の初期接着数が増加することを明らかとした。また、細胞のコラーゲン分泌を可視化させる技術を確立し、細胞内でのコラーゲン整合性プロセス並びに分泌状況のその場計測ができることを明らかとした。これらの技術を活用することで、将来の再生医療用足場材料並びに創薬開発のデバイスに役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the aligned collagen fibrils and sugar modification of collagen as well as the formation factors of oriented extracellular matrix of collagen fibrils, gradient materials of collagen and hydroxyapatite by electrochemical reaction and the glycosylated collagen using thiolate reaction were succeeded. It was revealed that glycosylation increased the initial adhesion number of fibroblasts. We also established a technique to visualize collagen secretion from cells and clarified that in situ collagen integrity process and in situ measurement of secretion status. By utilizing these technologies, it can be expected to be useful for future scaffolds for regenerative medicine and devices for drug discovery development.

研究分野：生体材料

キーワード：生体外マトリックス 細胞分泌 コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスの一種であるコラーゲンは、生体組織に広く存在し、タンパク質の約30%をも占めるため、再生医療を実現するバイオマテリアル(足場材料)として最も重要な素材のひとつである。コラーゲンは、組織中で線維(0.3~3 μ m)を形成し、引張・圧縮・ねじれといった力学的負荷に耐える構造をつくる。また、コラーゲンには、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD配列)といった細胞接着部位(インテグリンと結合)があると共に、機能的タンパク質(フィブロネクチン・ラミニン・ビトロネクチンなど)やプロテオグリカンと呼ばれる多糖類(グリコサミノグリカン)と結合して細胞との接着・移動・分化・増殖・成熟、さらにシグナル伝達を促進する。つまり、細胞は細胞外マトリックスに接着することで機能を発現することから、コラーゲンを基材とした優れたバイオマテリアルの創出が期待できる。コラーゲンは、グリシン(Gly)-Xaa-Yaaの繰り返しといった固有の配列をとり、約1000個のアミノ酸からなる α ヘリックス構造をつくる。Xにはプロリンが、Yにはコラーゲンの熱的安定性と相関するヒドロキシプロリンが配置する。3本の α 鎖からなる三重らせん構造をとる棒状のコラーゲン分子(300 \times 1.5nm)は、1/4ずつずれてコラーゲン原線維(10-300nm、周期構造67nm)をつくり、この原線維が水素結合によりコラーゲン線維を構成する。コラーゲンの細胞に対する機能的性は主にリシン側鎖が分子修飾・架橋されることに強く関係するが、十分には解明されていない。

細胞のコラーゲン生合成の経路では、まずリボソーム内のタンパク質翻訳でプロコラーゲン、三重らせん構造を細胞内でつくらせないために存在するプロペプチドのつながった長い一本の鎖がつくられる。これが小胞体・ゴルジ体へ移動して、プロリンやリシンがヒドロキシル化や糖鎖付加などで分子修飾され、プロペプチド部分がジスルフィド結合で自己会合して3本の α 鎖からなる三重らせん構造となる。この構造は細胞との相互作用に重要となる。その後、細胞外に分泌されてプロペプチド部位が酵素で切断され、自己組織化により原線維や線維が構築される。美容・健康分野や医薬・医療分野など多分野からのコラーゲン素材への注目を背景として、この生合成経路を利用した扱いが容易な酵母や植物からヒト型のリコンビナントコラーゲンを合成する技術も開発されている。しかし、合成されたコラーゲンは高次構造をとらず、角膜実質・鱗・骨に観測されるコラーゲン線維の配向層状構造がどのように形成されるかは現在も不明である。配向層状構造の形成機構を生物学的に理解し、配向したコラーゲン線維層が交互に直行する構造変換因子を探索し、材料工学的に再現することが本研究の目的である。

2. 研究の目的

魚鱗はヒトの角膜・皮質骨・歯と同じコラーゲン3次構造をとるが、ヒト組織とは異なり何度も迅速に再生する。その構造の再生機構の解明を基盤として、材料工学的にコラーゲン組織の配向層状構造を構築する技術を創出し、生体組織(軟骨・靭帯・角膜実質など)の治癒や成長過程と同期する『組織応答型バイオマテリアル』の開発を目指す。この学際的基礎研究を行うには材料工学と細胞工学とを融合し、生体修復材料として機能的に優れたセラピアの鱗を研究対象として、

(1)コラーゲン線維の配向制御技術・糖鎖修飾技術の確立による材料の物理化学特性の解明

(2)鱗の基質形成細胞を用いたコラーゲン線維の配向層状構造の生物学的成因の探索・作用

の二点からなる「さかなコラーゲンバイオサイエンス」を確立する。

3. 研究の方法

凍結乾燥されているうろこコラーゲンを塩酸又はリン酸に溶解させ、さらに水酸アパタイト粉末を加えて、pHを塩酸・又はリン酸で調整した溶液を作製した(電気化学反応法)。これに白金の対向電極を設置し、電極間距離及び電流値を変化させて、コラーゲン線維形成とアパタイト(HAp)の生成を生じさせた。作製した複合体は、走査型電子顕微鏡(FE-SEM)、赤外線分光(FT-IR)、熱分析(TG-DTA)、粘弾性試験などにより分析を行った。一方、うろこコラーゲンからなる線維膜(多木化学社製)に糖修飾を行った。 γ -チオブチロラクトンをコラーゲン線維膜に作用させ、リシン残基にチオールを導入した。さらに、2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンに触媒として、UV照射を行い、アリル- α -D-グルコピラノシドを、導入したチオールと反応させた。作製した各試料は、X線光分光法(XPS)、核磁気共鳴分光(1 HNMR)、熱分析(DSC)により、分析した。また、初期の細胞接着性に関して、マウスの線維芽細胞様細胞(NIH3T3)を用いて細胞接着性を検討した。

コラーゲン線維配向を明らかにするため、プレプロコラーゲンの α 1鎖のcDNAにEGFPとmCherryのDNA断片をC又はN末端及びコラーゲン本体に挿入した遺伝子発現ベクター(プラスミド)を作製した。これを、NIH3T3に導入することにより、コラーゲン分泌過程を明らかとし、コラーゲン線維の配向形成に与える生物学的要因を、その場計測した。

4. 研究成果

電気化学反応法により作製した複合体では、コラーゲンの線維形成とアパタイトの生成によるゲルが、いずれの電流値(6、12、24A/m²)でも得られた(図1)。熱分析の結果

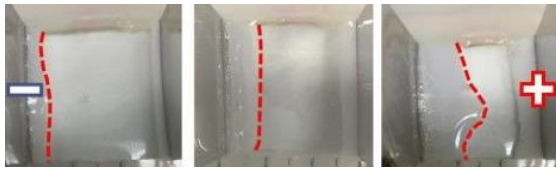


図1 各電流値で作製したゲル；左側：陰極、右側：陽極。左の写真から6、12、24A/m²の結果である。

から、無機含有量は、初期の溶液に溶解させた HAp の溶解量にも依存するが、コラーゲン重量に対して 5~25wt%であった。作製したゲルを陰極からの距離で、TG-DTA の分析を行ったところ、陰極側では HAp の生成量が多く、陽極側では HAp の生成量が少なかった。つまり、電気化学反応法により作製した複合ゲルは、HAp の生成量に傾斜が生じていることを明らかとした(図2)。また、電流密度が低いほど反応は遅く、ゲルの生成による急激

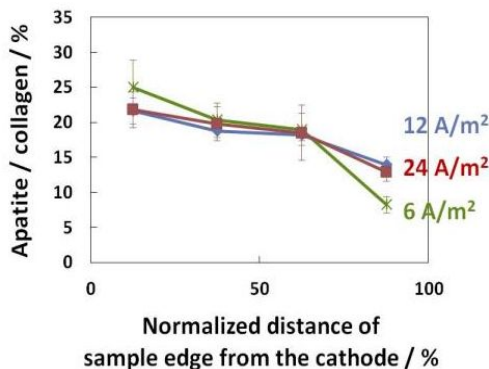


図2 陰極側からの距離による HAp/Col 含有量な電圧上昇が認められた。

各ゲルを凍結乾燥させた、ゲル内部の構造を観察した。その結果を図3に示す。図から明らかとなり、コラーゲン線維と球状の HAp 結晶が観察された。電流密度が低い場合(6A/m²)には、コラーゲン線維径が小さく(陰極側 26nm、陽極側 51nm)、電流密度が高い場合(24A/m²)には、コラーゲン線維(陰極側 67nm、陽極側 80nm)が大きくなることを明らかとした。また、HAp の結晶の大きさは、コラーゲン線維径と逆となり、低電流密度では約 150nm で、高電流密度では 40nm で

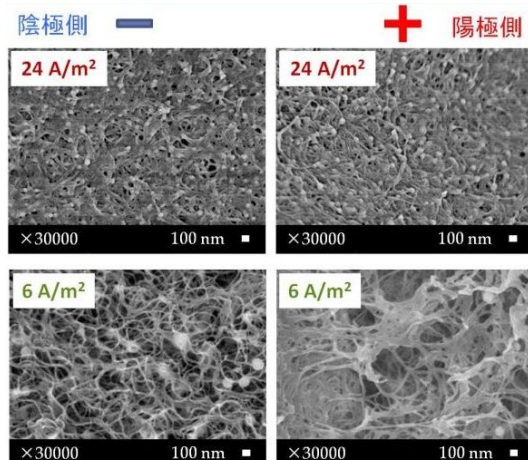


図3 FE-SEM による構造観察の結果

あった。これらの違いは、陰極から生成される水酸化物イオンの量に依存していた。

粘弾性の結果を図4に示す。電流密度と tanδ の値を示す。tanδ の値が小さいほど、弾性体としての特性を示すことから、コラーゲン線維径が大きくなるほど、弾性体としての特性になったと考えられる。また、出発物質を塩酸からリン酸に変えることで、気泡の発生が抑制されることを見出した。

コラーゲン膜 (Col_m)、チオール化コラーゲン膜 (Col_m_SH)、グリコシル化コラーゲン膜 (Col_m_Glu) に対して、XPS による組成分析を行った。その結果を図4に示す。図に示す通り、Col_m では S2p に帰属されるピークが検出されなかったが、チオール化及びグリコシル化した試料では、S2p が 168eV に検出された。このことから、チオールの修飾が出来たと考えられる。また、O1s のピーク分離では、グリコシル化による酸素ピークの変化が検出された。この結果は今後更なる検討が必要である。一方で、N1s のピークには変化が認められず、チオール化とグリコシル

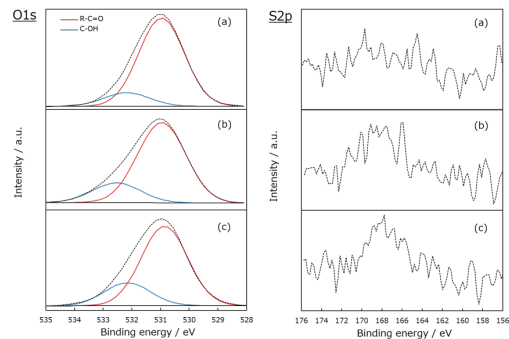


図4 XPS スペクトル；(a) Col_m、(b) Col_m_SH、(c) Col_m_Glu

化によるコラーゲンの骨格構造の変化は生じていないことが分かる。

さらに、¹H-NMR の結果から、C-SH 及び CH₂-O のピークに変化が認められ、グリコシル化に成功していると考えられる。これら修飾したコラーゲン膜の変性温度を調べた結果、チオール化による変性温度の変化は観測されなかったが、グリコシル化したコラーゲンでは、変性温度が 47.2 °C まで低下していた。グリコシル化により、コラーゲン分子の安定性が低下したことが分かる。これに対応して、引張強度は、Col_m_Glu では 96MPa と、Col_m と Col_m_SH の 120MPa と比較して明らかに低下していた。NIH3T3 の細胞培養の結果、他のコラーゲン膜と比較して、グリコシル化したコラーゲン膜は細胞接着性に優れていることが分かった。

作製したプラスミドを発現させた細胞を用いて、EGFP - コラーゲン融合タンパク質の分泌過程を、これまでと同様の方法で、分析を進め、より高解像度でのデータ取得に成功した。また、株化した細胞の作製にも成功した。mCherry と EGFP を導入することで、細胞内では、N 又は C 末端を保持している状態(図5)を観察した。この結果は、我々がこ

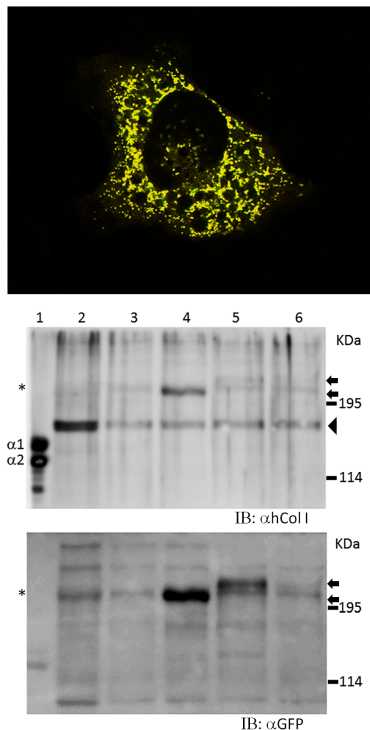


図 5 導入したプラスミドによるコラーゲン発光部位(上)と分泌したコラーゲンのウエスタンブロット図(下)

れまでに報告している結果と同様である。細胞の極性に応じて、C末端は細胞の下側に異動して細胞外に分泌される。しかし、N末端は上側に堆積され、細胞内での消化が行われ、細胞外へと分泌される量が極めて少なかった。分泌されたタンパク質のウエスタンブロットの結果、コラーゲン分子と mCherry 又は EGFP を足した分子量に相当するバンドが検出されたことから、これら蛍光タンパク質を含んだコラーゲン分子を細胞が生成していることが明らかであった。細胞外への分泌を確認できたことから、創薬に役立つバイオ診断システムの構築が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Kajiwara D, Ikoma T, “Collagen and hydroxyapatite composite membranes as drug-carrying support for biomedical applications”, 査読有, *Mrs Advances*, 2(19-20) 1083-1088 (2017) DOI: 10.1557/adv.2017.26

Tanaka T, Ochi H, Takahashi S, Ueno N, Taira M, “Genes coding for cyclin-dependent kinase inhibitors are fragile in *Xenopus*”, 査読有, *Developmental Biology*, 426, 291-300 (2017)

Haramoto Y, Saijyo T, Tanaka T, Furuno N, Suzuki A, Ito Y, Kondo M, Taira M,

Takahashi S, “Identification and comparative analyses of Siamois cluster genes in *Xenopus laevis* and *tropicalis*”, 査読有, *Development Biology*, 426, 374-383 (2017)

Igashira H, Kamo M, Kyomoto M, Ikoma T, “Fabrication of hydroxyapatite microparticles including silver nano-dots at grain boundary for long-term antimicrobial property”, 査読有, *Mrs Advances*, 2(24) 1285-1290 (2017) DOI: 10.1557/adv.2016.65

Kawamata H, Kuwaki S, Mishina T, Ikoma T, Tanaka J, Nozaki R, “Hierarchical viscosity of aqueous solution of tilapia scale collagen investigated via dielectric spectroscopy between 500 MHz and 2.5 THz”, 査読有, *Scientific Reports*, 7 (2017) DOI: 10.1038/srep45398

Sugiyama T, Akiyama S, Ikoma T, “Calcium phosphate with high specific surface area synthesized by a reverse micro-emulsion method”, 査読有, *Mrs Advances*, 1(11) 723-728 (2016) DOI: 10.1557/adv.2016.68

Hsu HH, Uemura T, Yamaguchi I, Ikoma T, Tanaka J, “Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on fish scale collagen”, 査読有, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(2) 219-225 (2016) DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.01.001

Oh HH, Uemura T, Yamaguchi I, Ikoma T, Tanaka J, “Effect of enzymatically cross-linked tilapia scale collagen for osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells”, 査読有, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 31(1) 31-41 (2016) DOI: 10.1177/08839115155595240

Ishii S, Sugiyama T, Cross JS, Ikoma T, “Effects of particle sizes and natural polymers on mechanical properties of alpha tricalcium phosphate cements”, 査読有, *Mrs Advances*, 1(18) 1277-1282 (2016) DOI: 10.1557/adv.2016.253

Matsuyama S, Sugiyama T, Ikoma T, Cross JS, “Fabrication of 3D graphene and 3D graphene oxide devices for sensing VOCs”, 査読有, *Mrs Advances*, 1(19) 1359-1364 (2016) DOI: 10.1557/adv.2016.151

Chen HM, Hanagata N, Ikoma T, Huang JY, Li KY, Lin CP, Lin FH, “Hafnium-doped hydroxyapatite nanoparticles with ionizing radiation for lung cancer treatment”, 査読有, *Acta Biomaterialia*, 37 165-173 (2016) DOI: 10.1016/j.actbio.2016.04.004

Chen S, Du XX, Jia L, Chang HX, Ikoma T, Hanagata N, “Synthesis and osteo-compatibility of novel reduced graphene oxide-aminosilica hybrid nanosheets”, 査読

有, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 61 251-256 (2016) DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.05
Matsumoto R, Uemura T, Xu ZF, Yamaguchi I, Ikoma T, Tanaka J, "Rapid oriented fibril formation of fish scale collagen facilitates early osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells", 査読有, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(8) 2531-2539 (2015) DOI: 10.1002/jbm.a.35387

〔学会発表〕(計 11 件)

生駒俊之, "セラミックスの多機能化と表面特性", 第 17 回日本再生医療学会, 2018 年 3.21、横浜 (パネリスト)

Irawan V, Ikoma T, "Pre-magnetic treatment and electrolysis methods as a novel strategy to obtain collagen based bilayer scaffold", 日本セラミックス協会 2018 年年会, 2018 年, 3.16、東北大学

Kajiwara D, Ikoma T, "Laminated hydroxyapatite/collagen membranes with different compositions", Asia Bioceramics Congress, 2018.11.30, Okayama

Ushijima S, Ikoma T, "Fabrication of mesoporous silica thin film platforms for surface reaction with surface plasmon resonance", *Bioceramics* 29, 2018.11.26, France

生駒俊之, "うろこコラーゲンの医療機器への応用展開", 日本金属学会、北海道、2017. 9. 7 (依頼公演)

Ikoma T, "Hydroxyapatite and its related composites for tissue engineering", *International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (ISOMRM)*, Taiwan, 2017. 8. 24 (招待講演)

Ikoma T, "Fish scale collagen and its composites for tissue engineering", *International Symposium of Biotechnology on Biomaterials, Stem cells and Tissue Engineering (ISBBT)*, Taiwan, 2017. 8. 20 (招待講演)

Ikoma T, "Functionalized luminescent hydroxyapatite nanorods for bioimaging", *International Symposium on Nanomedicine (ISSNM2016)*, Tsukuba, 2016. 11. 25 (招待講演)

生駒俊之, "人工骨 (骨補填材) 開発における組成・構造の影響とその評価", 技術情報協会 セミナールーム、東京、2016. 5. 23

生駒俊之, "材料科学者から見た人工骨の開発", 東京、整形外科バイオマテリアル学会、2015. 12. 2. (招待講演)

Ikoma T, "Scale collagen and hydroxyapatite nanocomposites for artificial bone", *Asia Biomaterials Congress*, Taiwan,

2015. 5. 7. (招待講演)

〔図書〕(計 4 件)

浜野凌平、生駒俊之, "3Dプリンターでつくる人工骨～リン酸カルシウム・複合体～", *Materials Stage*, 117(8), 1-4, (2017)

Watanabe H, Ikoma T, "Artificial bone", *Japanese Journal of Artificial Organs*, 45(3) 183-187 (2016)

生駒俊之, "第1章 生体物質とナノテクノロジー", 編著者: 生駒俊之、田中順三、"ナノバイオとナノメディシン 医療応用のための材料と分子生物学", コロナ社、1章と4章の一部 (2015.10.2)

生駒俊之、田中利明, "第9章 医療", 野田公彦監修 "水溶性高分子の最新動向", 株式会社シーエムシー出版、p117-126、(2015.11.13)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.ceram.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生駒 俊之 (IKOMA, Toshiyuki)

東京工業大学・物質理工学院・准教授
研究者番号: 20370306

(2) 研究分担者

田中 利明 (TANAKA Toshiyuki)

東京工業大学・生命理工学院・助教
研究者番号: 40263446