

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01398

研究課題名(和文) 骨コラーゲンの新規精製法の確立と遺伝子発現量比較による骨関連細胞の機能解析

研究課題名(英文) Establishment of new purification method for bone collagen and functional analysis of bone-related cells by comparing gene expression levels

研究代表者

森本 康一 (MORIMOTO, KOICHI)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：10319741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨の90%は、リン酸カルシウムとI型コラーゲンでできている。コラーゲンは架橋することで物理的強度を高めていることから、その抽出回収は容易ではなかった。本課題では、骨組織から独自の方法で骨コラーゲンを回収する方法を確立し、その機能を骨関連細胞で検証することを目的とした。その結果、温和な条件で効率的に骨由来I型コラーゲンを再現性良く精製することに成功した。LC-MSで骨コラーゲンの水酸基などの翻訳後修飾を同定した。また骨コラーゲンを培養足場として活用した結果、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導が短期間に進むことを確認した。これまでにない骨コラーゲンの再生医療への活用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で、精製した骨コラーゲンの構造や性質を調べ、皮膚コラーゲンとの差異を明らかにした成果は学術的価値が高いと考える。また、これまで食用牛や豚の非食部として価値が低かった骨からコラーゲンを回収する有用な手法を確立した点は今後の応用につながる成果である。このように、廃棄される骨に新たな価値を見だし、その活用分野として再生医療への展開を示した意義は大きい。将来、コラーゲンの原料組織として骨が皮膚と同様に注目され、有効利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：90% of bone is made of calcium phosphate and type I collagen. Since collagen has increased physical strength by cross-linking, its extraction and recovery was not easy. The purpose of this study was to establish a unique method for recovering bone collagen from bone tissue and to verify its function in bone-related cells. As a result, we succeeded in efficiently and efficiently purifying bone-derived type I collagen under mild conditions. Post-translational modifications such as hydroxyl groups of bone collagen were identified by LC-MS. As a result of utilizing bone collagen as a culture scaffold, it was confirmed that the induction of differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts proceeded in a short period of time. It is expected that bone collagen will be utilized in regenerative medicine like never before.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：コラーゲン 骨組織 翻訳後修飾 間葉系幹細胞 培養足場 qRT-PCR 骨芽細胞分化誘導 軟骨細胞分化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 1. 研究開始当初の背景

動物の結合組織は同じ遺伝子産物であるI型コラーゲンで主に形成されているが、その構造は大きく異なる。例えば、軟組織の真皮・腱と硬組織の骨・象牙質などは、硬さと形状がまったく異なる(図1)。しかし現在でも、その構造形成の差異は分かっていない。その大きな理由として、硬組織由来のコラーゲンの抽出精製が成功していなかったことが挙げられる。しかし、我々はこれまでに脛骨と象牙質の組織からI型コラーゲンを抽出精製する技術を開発した(図2, 特願 2015-215122)。

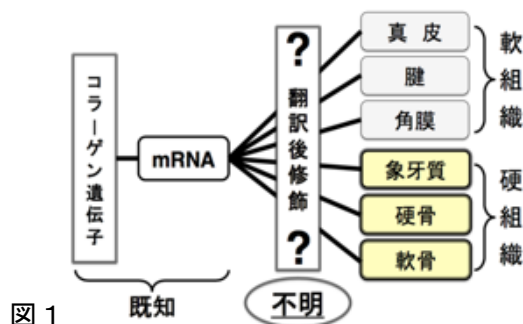


図1

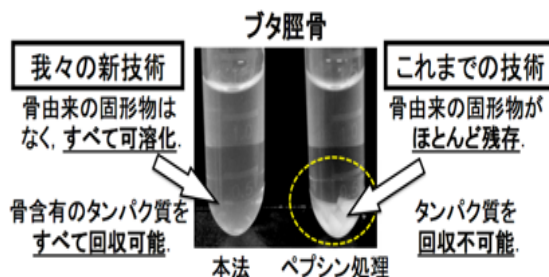


図2

さらに、コラーゲン線維形成に必要なアミノ酸配列などを報告した(Kunii, Morimoto, et al., *J.B.C.* 2010; Morimoto, et al., *J.Biochem.* 2012)。その後、2013年までにJST A-STEP探索タイプでコラーゲン関連の研究が2件採択され、その成果を発展させ、2013年採択のJST A-STEPハイリスク挑戦タイプ(AS2414037F)では再生医療を加速させる細胞低接着性コラーゲンの創製を進め(森本と國井, バイオインダストリー(2015年), 森本と國井, 化学と工業(2015年), 特願 2014-37625, 2014-94285, 2014-94286, 2015-212309, 2015-215122 など), AMED では「事後評価『A』」と認定された。2015年にはJST A-STEPシーズ育成タイプに「細胞分化を短期間で促進する培養試薬の開発(AS2715177U)」で採択され、2020年3月まで研究をさらに発展させてきた。

コラーゲンに関する研究開発を進めているうちに、簡便に骨コラーゲンの製品化が可能となると産業界にも大きなインパクトになると確信するようになった。なぜなら、畜産業界で廃棄されていたブタやウシの骨が有望な生体材料を生み出す価値ある原材料に変わるからである。しかも、再生医療などの細胞培養で使用される可能性も秘めている。このような着想に基づき、骨コラーゲンの研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本課題では、組織別コラーゲン分子の翻訳後修飾をLC/MS質量分析計を用いて世界で初めて調べることが目的とした。さらに、硬組織に局在する骨芽細胞と軟骨細胞への作用を遺伝子発現量の変動を解析することで明らかにすることを計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) LC-MS質量分析計による翻訳後修飾の官能基の有無と種類の詳細な解析

森本は、MALDI-TOF/TOF MS(4700, ABI社)を用いてタンパク質の網羅的同定で成果を挙げ(Nagai, Morimoto, et al., *Electrophoresis*, 2008; Kunii, Morimoto, et al., *J.B.C.* 2010; Nagai, Morimoto, et al., *J.Appl.phycol.*, 2013; Nagai, Morimoto, et al., *Mar. Biotechnol.*, 2013), 最近では近畿大学生物理工学部において、共通機器であるLC/MS(TripleTOF5600, ABSCIEX社)による翻訳後修飾を同定できる研究環境を有している。これまでの予備実験において、骨コラーゲンと真皮コラーゲンの異なる部位での水酸化を見出している。よって、本課題ではさらに骨と真皮・腱のコラーゲン構造の差異(翻訳後

修飾)を詳細に同定し、その官能基の定量解析から、組織別コラーゲンの翻訳後修飾を明らかにする。

#### (2) 硬組織と軟組織のI型コラーゲンの天然構造の安定性や線維形成速度などの物性比較

骨や真皮・腱の組織構造は大きく異なるが、その形成メカニズムはよく理解されていない。よって、骨コラーゲンの真皮・腱コラーゲンとの差異を調べるため、熱安定性を円二色性スペクトル測定による融解曲線と濁度測定による線維形成解析を実施する。組織コラーゲンの種類によって線維形成速度が変化するので、速度変化などを明らかにする。

#### 3)骨コラーゲン塗布培養皿で培養した骨芽細胞と軟骨細胞の遺伝子発現量の解析

骨組織の主な有機構成成分であるコラーゲンが骨周辺部に局在する細胞にどのような環境を提示するかも興味深い。具体的には、ラットの初代細胞として骨芽細胞(OBC01, コスモバイオ社)を購入し、骨コラーゲンを塗布した培養皿で培養する。培養後経時的にアルカリホスファターゼ染色とアリザリンレッドS染色により、骨芽細胞の機能発現を明らかにする。また、細胞のRNAを抽出し、定量RT-PCRにより骨特異的タンパク質の発現量を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) ブタ脛骨とウシ象牙質のI型コラーゲン抽出の最適化と精製

酵素処理は骨組織から可溶化したI型コラーゲン(以下、コラーゲンと略す)を得ることを目標とした。具体的には、ブタ脛骨を屠殺場から入手し、骨を細断して0.5M EDTAにて4°Cで2週間、脱灰処理した。風乾後、特願 2015-215122 記載の方法を基に、可能な限りコラーゲンの天然構造が保持される酵素反応条件(温度、pH など)を最適化した(図3)。最適条件はノウハウなので秘匿にする。抽出した骨コラーゲンは、20%飽和硫酸アンモニウムによる塩析を繰り返すことにより精製する。ウシ象牙質は北海道大学名誉教授の久保木芳徳先生(研究協力者)から供与いただき、象牙質コラーゲンを精製したが、骨組織より可溶化度が低いため、今回は骨組織を重点的に調べることにした。

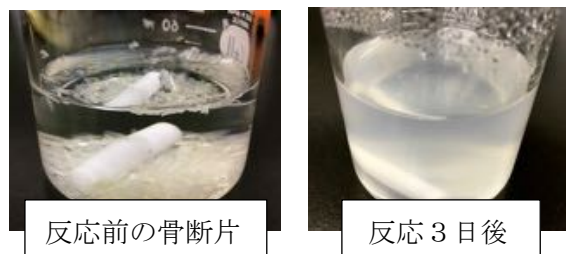


図3 ブタ脛骨からのコラーゲンの抽出

#### (3) 精製したコラーゲンの分子量と純度の確認

精製した骨組織コラーゲンの分子量と純度を5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて調べた。また、コラーゲン以外のタンパク質の存在の有無を確認した(図4)。

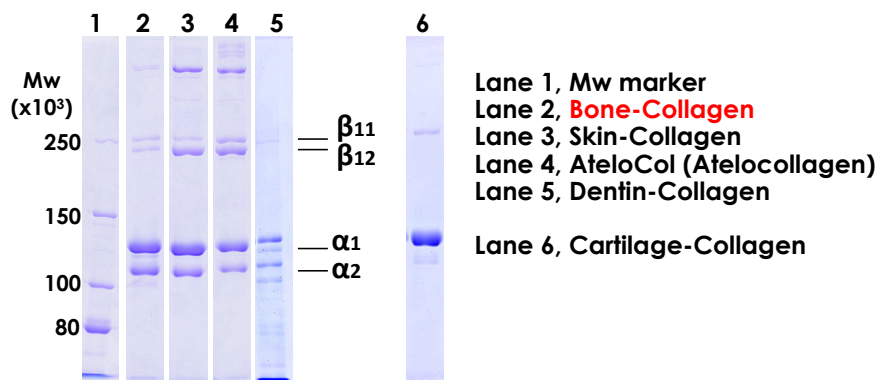


図4 ブタ脛骨、象牙質から精製したI型コラーゲン、硝子軟骨から精製したII型コラーゲン

(3) LC/MS による翻訳後修飾の同定(研究協力者:生物理工学部永井宏平准教授と共同作業)

精製したブタ骨コラーゲンは冷アセトン沈殿処理し、沈殿物を還元アルキル化、トリプシン消化、ZipTip による脱塩処理の後、LC/MS(Triple TOF5600+, SCIEX)にて翻訳後修飾を決定した。Pro 残基の水酸基修飾を調べた結果、骨と皮膚の I 型コラーゲンでも異なる位置での水酸基を見出した。また、複数の製造企業が市販する皮膚コラーゲン製品に異なる位置の水酸基が存在することを見つけた。現在、特許出願検討中であつた未発表なので実験データの詳細は省くが、貴重な結果が得られたと考える。

(4) 精製したコラーゲンの天然構造の検証

円二色性測定装置(J-820, 日本分光社製)を用いて、コラーゲンの天然構造(3本鎖らせん構造)を 220nm 付近のスペクトルから定量(CD 値/濃度)した。また、熱転移曲線を測定し、組織別の熱安定性(転移温度)を決定し、組織別I型コラーゲンの構造上の同等性と差異を明確にした(図5)。

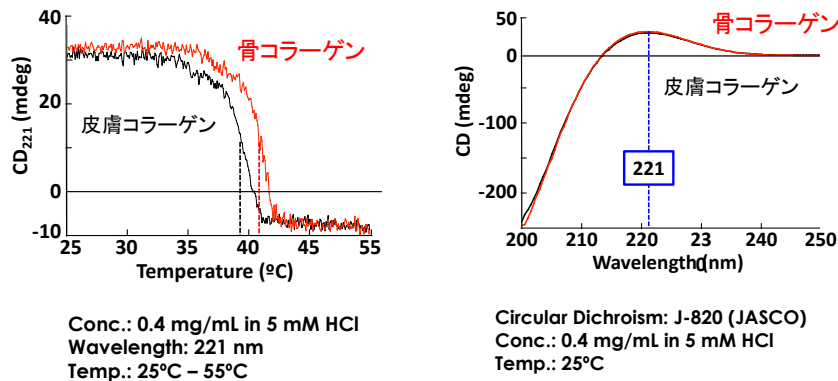


図5 ブタ脛骨から精製した I 型コラーゲンの熱転移曲線 (左図) と円二色性スペクトル測定 (右図)

(5) 精製した骨コラーゲンの線維形成速度の測定

3本鎖らせん構造を保持するコラーゲンは生理条件下で自発的に集まり、規則性のある線維構造を形成する。よって、線維形成速度を調べることで骨コラーゲンの特徴を明らかにできる。骨コラーゲンをリン酸緩衝液(pH7.4)で 0.2mg/mL に調製し、20°Cから 36°Cまで昇温させ、同時に 330nm の吸光度(濁度)を測定することで線維形成を速度論的に解析した(図6)。骨コラーゲンの線維形成速度は著しく早いことが示された。

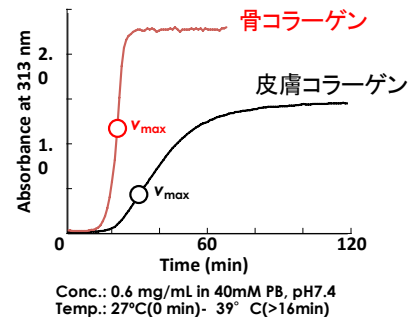


図6 I 型コラーゲンの線維形成速度の測定

(6) 骨コラーゲン上での軟骨細胞培養の検討

ATDC-5 軟骨前駆細胞を播種し、酸性ムコ多糖を染色するアルシアンブルー染色により軟骨細胞への分化誘導を観察した(図7)。その結果、骨コラーゲン上で培養した ATDC-5はスフェロイドを形成し、短期間に軟骨細胞に分化誘導することが示された。一方、コントロールの培養皿では ATDC-5 は培養皿底面に増殖してコンフルエントになるが、軟骨細胞への分化は認められなかった。

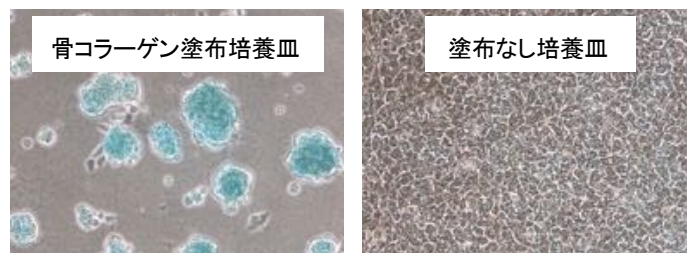


図7 ATDC-5 細胞の軟骨細胞分化誘導

(7) 骨コラーゲン上での間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導培養

ラット骨髄間質細胞(初代細胞)を購入し(コスモバイオ社), 骨コラーゲン上で培養した. 分化培地で培養後, アリザリンレッド染色(図8A), アルカリホスファターゼ染色(図8B)とその遺伝子発現量解析(図8C, 対象遺伝子:*Alpl*, ハウスキーピング遺伝子:*Ywhaz*)により骨芽細胞への分化誘導能を考察した. そのほか, SPARC, オステオカルシン, BMP2 などの発現量を定量 RT-PCR(タカラバイオ)にて解析した. 結果は紙面の関係で主だった結果のみを示す. さらに, 未分化細胞マーカー, 脂肪細胞マーカー, 軟骨細胞マーカーなどの遺伝子も qRT-PCR で測定し, 総合的な骨芽細胞への分化誘導を評価した. その結果, 骨コラーゲン上で培養した間質細胞は短期間に骨芽細胞へ有意に分化誘導することが証明された. そのメカニズムについては, 現在詳細に解析中である.

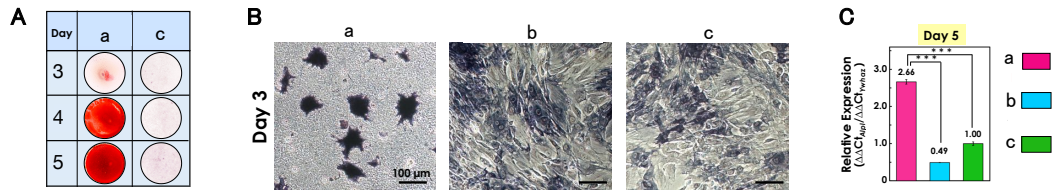


図8 ラット間質細胞の骨芽細胞分化誘導(a: 骨コラーゲン, b: 皮膚コラーゲン, c: 塗布なし)

(8) 骨コラーゲン上での頭蓋骨細胞の培養

骨コラーゲンでの頭蓋骨由来の成熟骨芽細胞培養は, 骨芽細胞の維持培養で重要な培養技術となりうる. よって, 本課題ではラット頭蓋骨(初代細胞)を購入し(コスモバイオ社), 骨芽細胞の指標となるアリザリンレッド染色(未掲載)やアルカリホスファターゼ染色(図9)などにより骨コラーゲン上で培養した頭蓋骨細胞の脱分化程度を観察した. 遺伝子の定量 RT-PCR にて解析した結果は未発表のため省略するが, *Alpl*, *Bglap*, *Bmp* などの遺伝子発現量が有意に増加していることが確認された. つまり, 骨コラーゲン上で培養した頭蓋骨由来の成熟骨芽細胞は *in vitro* で培養しても分化を維持している細胞が多く, 脱分化した細胞数は塗布なし培養に比べて著しく少ないことが示された. よって, 骨コラーゲンは骨芽細胞の分化維持培養に利用可能と考えられる.

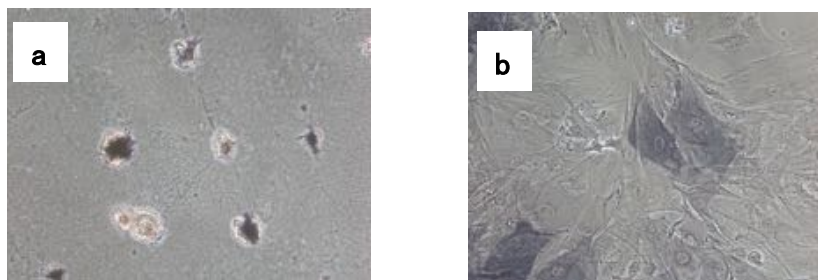


図9 ラット頭蓋骨細胞の骨芽細胞分化維持能の観察 アルカリホスファターゼ染色 (a: 骨コラーゲン, b: 塗布なし)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Koichi Morimoto and Saori Kunii	4. 巻 8
2. 論文標題 Latent nature of collagen in promoting three-dimensional adherent spheroid formation of fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materialia	6. 最初と最後の頁 100450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.mtla.2019.100450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 S. Kunii, K. Morimoto
2. 発表標題 Low adhesive scaffold collagen prepared from type I collagen induces the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells
3. 学会等名 ECTS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Kunii, K. Morimoto
2. 発表標題 Low adhesive scaffold type I collagen prepared from porcine skin regulates the expression of genes relating to osteogenic differentiation
3. 学会等名 ECTS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Kunii, K. Morimoto
2. 発表標題 Low Adhesive Scaffold Type I Collagen Prepared From Porcine Skin Regulates The Expression Of Genes Relating To Osteocyte Differentiation
3. 学会等名 ASCB&EMBO2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Kunii, N. Nakano, K. Kanekiyo, K. Omae, C. Ide, K. Morimoto
2. 発表標題 Low Adhesive Scaffold Collagen Prepared From Type I Collagen Promotes Neuronal Survival And Neurite Outgrowth
3. 学会等名 ASCB&EMBO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國井沙織, 森本康一
2. 発表標題 PCR Arrayを用いた細胞低接着性コラーゲンの骨芽細胞分化誘導の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國井沙織、永井宏平、森本康一
2. 発表標題 プロテアーゼによる骨組織の可溶化とタンパク質の同定
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (京都)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井宏平、國井沙織、中居由香理、森本康一
2. 発表標題 真皮コラーゲンのLC-MS/MSを用いた翻訳後修飾の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (京都)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國井沙織、堀内喜高、森本康一
2. 発表標題 骨組織から抽出したI型コラーゲンの骨芽細胞分化誘導
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（京都）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saori Kunii and Koichi Morimoto
2. 発表標題 Low adhesive scaffold type I collagen prepared from pig shinbone induces the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells
3. 学会等名 45th European Calcified Tissue Society Congress (Valencia, Spain) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國井沙織、堀内喜高、伊田寛之、平岡陽介、森本康一
2. 発表標題 骨組織から抽出した細胞程接着性コラーゲンの骨芽細胞分化誘導
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会大会（神戸）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國井沙織、堀内喜高、山本 衛、久保木芳徳、森本康一
2. 発表標題 骨組織から精製したI型コラーゲンの骨芽細胞分化誘導
3. 学会等名 第35回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Saori Kunii and Koichi Morimoto
2. 発表標題 Low adhesive scaffold type I collagen prepared from pig shinbone induces the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells
3. 学会等名 45th European Calcified Tissue Society Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國井沙織、堀内喜高、伊田寛之、平岡陽介、森本康一
2. 発表標題 ヒト間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化誘導を促進する細胞低接着性コラーゲン
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國井沙織、堀内喜高、伊田寛之、平岡陽介、森本康一
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンにより制御される骨芽細胞への分化誘導遺伝子群の解析
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 コラーゲン固形物、コラーゲン固形物の製造方法、および、生体材料	発明者 森本康一、國井沙織	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018 - 232811	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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