

平成20年4月21日現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2006～2009
課題番号：18380109
研究課題名 (和文) 再生鱗をモデルとしたコラーゲン配向機構の解明—魚コラーゲンから生体修復材料を造る
研究課題名 (英文) Studies on the cellular mechanism of collagen fibril alignment in the regenerating scales of goldfish: toward the bioinspired fabrication of artificial cornea
研究代表者 都木 靖彰 (TAKAGI YASUAKI)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：10212002

研究分野：水産生命科学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：コラーゲン，配列制御，変性温度，組織再生医療用材料，角膜再生，骨再生，ウロコ，キンギョ

1. 研究計画の概要

臓器移植に変わる新しい医療として再生医療が進展しつつあるが、角膜・靭帯など再生能の低い組織に関してはその機能を代替する人工基質が必要となる。哺乳類コラーゲンに比べて安全性の高い魚類コラーゲンをを用いて人工基質を合成することを最終目標に、その基礎技術開発に資するため、本申請課題では以下の点を解明する。

- (1) 培養細胞を用いて高次配列コラーゲンを作製することを目標に、培養のための幹細胞を探索するとともに、その分化因子を同定し、分科機構を解明する。
- (2) ウロコに認められる角膜様の高次コラーゲン配列を制御すると予想される、非コラーゲン性タンパク質を同定する。
- (3) 魚類のI型コラーゲン分子種には $\alpha 1\sim\alpha 3$ 鎖がある。これらの組み合わせによりコラーゲンの物性が変化する可能性が考えられる。そこで $\alpha 1\sim\alpha 3$ 鎖遺伝子を同定し、その発現がどのように調節されているかを解明する。
- (4) コラーゲン線維を配向させるため、強磁場下で様々なイオン存在下・溶媒（水系・有機溶媒系）にてコラーゲンの一方向再線維化挙動を解明する。
- (5) 人為的に作製可能なコラーゲン溶液の濃度は1%程度であるため、鱗・角膜実質・靭帯に存在するコラーゲン線維密度とは程遠い。ソフトケミカル手法によりコラーゲンの高密度化を行う。

2. 研究の進捗状況

当初の計画以上に進展している。その理由を以下に示す。

- (1) ウロコ細胞の分化因子 Runx2, 基質タンパク質 SPARC, BGP をクローニングし、再生過程における発現解析により幹細胞存在部位を明らかにした。定量PCR系を確立し、再生過程における発現変動を定量した。当初計画をほぼ終了した。
- (2) これまでに基質の抽出と基質精製に最もじゃまとなるコラーゲンの分離に成功した。また、線維層板から sid4 を同定した。
- (3) $\alpha 1\sim\alpha 3$ 鎖の cDNA クローニング後定量PCR系を開発、組織により発現比率が異なることを解明した。ほぼ当初計画を終了した。
- (4) ブタ及びティラピアコラーゲン線維配向ゲルを、12T (テスラ) の磁場内ですでに実現した。
- (5) 湿潤環境下による乾燥により 10～20wt% の高密度化に成功した。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

上記 1, 3 に関しては当初計画の研究を完了し、次のステップに進むことが可能となった。また、2 に関しては成果が出始めたところであるが、研究遂行中に TOF-MS の導入およびその手法の確立、cDNA ライブラリのイムノスクリーニング法の確立がなされ、網羅的同定手法を用いたより効率性の高い方法が可能となった。4, 5 に関しては材料開発に成功するとともに、共焦点付原子間力顕微鏡や透過型電子顕微鏡用のトモグラフィー装置

などが導入され、材料物性や構造を新しい観点から解析することが可能となった。

4. 今後の研究の推進方策

上述のように、当初計画のかなりの部分がすでに達成されるとともに、新たな研究機器の導入などにより新しい手法・観点で研究を効率的に推進することが可能となった。そこで、研究全体の構想を練り直し、基質タンパク質の網羅的同定手法の採用と機能探索、材料の高次構造化、新手法による材料物性と構造の解明をめざす新たな研究を申請し、それに採用された(基盤研究(B), 課題番号 21380116)ため、本申請課題は 2008 年度で終了する。

5. 代表的な研究成果

(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 4 件)

- ① Ohira, Y., M. Shimizu, K. Ura and Y. Takagi Scale regeneration and calcification in the goldfish *Carassius auratus*: quantitative and morphological process. *Fish. Sci.*, 73: 46-54 (2007). 査読有
- ② Takagi, Y. and K. Ura Teleost fish scales: a unique biological model for the fabrication of materials for corneal stroma regeneration. *J. Nanosci. Nanotech.*, 7: 757-762 (2007). 査読有
- ③ 小川展弘・都木靖彰 硬骨魚類の鱗の石灰化機構を探る. *バイオインダストリー*, 24(12): 47-55 (2007). 査読無, 招待執筆
- ④ 都木靖彰 魚類のウロコに認められる角膜様のコラーゲン配列とその形成メカニズムの解明. *マテリアルインテグレーション*, 20(11): 20-26 (2007). 査読無, 招待執筆

[学会発表] (計 2 6 件)

- ① Ogawa, N., H. Tohse, K. Ura, M. Shimizu and Y. Takagi (2006) Discovery of matrix substance involved in hydroxyapatite formation from regenerating fish scales. Gordon Research Conference on Biomineralization, July 30- August 4, 2006, Colby-Sawyer College, New London, NH, USA. Poster presentation.
- ② Takagi, Y., H. Tohse and K. Ura (2006) Potential application of fish scale collagen in tissue engineering. 7th Korea-Japan, Japan-Korea Joint Symposium on Aquaculture, October

20-21, 2006, National Fisheries Research and Development Institute, Busan, Korea. Poster Presentation.

- ③ Imura K., H. Tohse, K. Ura and Y. Takagi (2006) Molecular tools to study scale forming cell differentiation -cDNA cloning and expression patterns of BMP2, Runx2 and SPARC-. 7th Korea-Japan, Japan-Korea Joint Symposium on Aquaculture, October 20-21, 2006, National Fisheries Research and Development Institute, Busan, Korea. Poster Presentation.
- ④ Ogawa, N., H. Tohse, K. Ura and Y. Takagi (2007) Screening and characterization of calcification-regulating proteins in the fish scale, a dermal skeleton similar to mammalian bone/dentin. Gordon Research Conference "Bones and Teeth", July 15-20, 2007, University of New England, Biddeford, ME, USA. Poster presentation.
- ⑤ Imura, K., H. Tohse, K. Ura and Y. Takagi (2007) mRNA expression patterns of BMP2, Runx2 and SPARC during scale regeneration in goldfish. Gordon Research Conference "Bones and Teeth", July 15-20, 2007, University of New England, Biddeford, ME, USA. Poster presentation.
- ⑥ Takagi, Y., Y. Ohira, N. Ogawa, K. Imura, H. Tohse and K. Ura (2007) Teleost fish scale is a unique model for studying regeneration of dermal skeletons. Gordon Research Conference "Bones and Teeth", July 15-20, 2007, University of New England, Biddeford, ME, USA. Poster presentation.
- ⑦ Ogawa, N., H. Tohse, K. Ura and Y. Takagi (2008) Plasma high density lipoprotein is incorporated into the matrix of fish scale and may act as mineralization inducer. Gordon Research Conference on Biomineralization, August 11, 2008, Colby-Sawyer College, New London, NH, USA. Poster presentation.