

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006年～2008年  
 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

研究成果の概要： ウロコのコラーゲンを用いて再生医療用人工基質の合成をめざして、生物学と材料科学の両面から研究を推進した。生物学的アプローチにより鱗形成細胞分化の分子機構、コラーゲン配向を制御する候補分子、組織ごとのコラーゲン $\alpha$ 鎖組成を明らかにした。また、材料科学的アプローチにより、ブタ及びティラピアコラーゲン線維配向ゲルを高磁場内で実現するとともに、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。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

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. 研究開始当初の背景

現在、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。しかし、いまだ実用的なものは開発されていない。

生体の細胞外基質の主要部分のコラーゲンであり、テロペプチドと呼ばれる部分を酵素的に切断した「アテロ化コラーゲン」は免疫性が極めて低く、人工基質材料として極めて有望な生体材料である。生体内においては、組織特異的にコラーゲンが高次に配向する

ことで強度や透明度などの物性を獲得し、細胞外基質は組織特異的な機能を発揮する。また、細胞外基質は細胞に情報を与え、その活性を制御する。すなわち、実用的な人工基質を開発するためには、コラーゲンの高次構造を模した人工基質の合成が必要となるが、従来法ではコラーゲンの配向を制御して基質を合成することは困難である。そこで、対象とする組織の形成・再生機構を分子レベルで解明し、それを模して配向を制御するBio-inspired技術が必要となる。

しかしながら、哺乳類では組織の再生能が

低く、研究の困難な分野も多い。たとえば、角膜は胎児期にしか合成されず、またほとんど再生しない（それゆえ、傷ついた角膜の治療には角膜移植しか方法がないため、人工角膜のニーズも高い）。そこで高い再生能を有する魚類など他動物をモデルとした研究が注目されている。たとえば、傷ついた心臓や脊髄の再生に関する研究がゼブラフィッシュを用いて進められている。

われわれが注目している魚類の鱗もまた、極めて高い再生能を有する硬組織である。鱗は構造の異なる2層よりなる。外層の骨質層の構造は哺乳類の繊維性骨と同等で、ランダムに3次元配列するコラーゲンと豊富な非コラーゲン性基質を持ち、それが強く石灰化する。内層の線維層板は、コラーゲンが一定方向に走る層が多数積層しており、しかも各層間でコラーゲンの走行方向が約90度回転する。この構造は哺乳類の層板骨に認められる構造と同等である。また、発生の起源がまったく異なる角膜にも同様の積層構造が認められる。鱗は抜け落ちると急速に再生する。骨質層の再生は繊維状骨を再生する機能であり、線維層板の再生は角膜様の高次配向積層コラーゲンの再生機能である。どちらも哺乳類には認められない特殊な能力であり、骨再生や角膜再生機構を解明するユニークなモデルとなる。このように鱗再生は、人工骨や人工角膜などのBio-inspired合成に貴重なデータを供給する『教科書』である。

これまでコラーゲン性の人工基質の材料としてはウシ、ブタのコラーゲンが用いられてきた。しかし、牛海綿状脳症（BSE）が日本でも発症して以来、人獣共通感染症のおそれのある哺乳類コラーゲンに替わり、その危険性の極めて低い魚類コラーゲンが注目されるようになった。しかし、魚類コラーゲンを材料とした人工基質の開発はおこなわれていなかった。鱗は上述のようにコラーゲンを多量に含み、しかも非可食部としてこれまで捨てられていた部分であるため、安全でしかも低コストなコラーゲン源として有望である。

## 2. 研究の目的

本プロジェクトの最終ゴールは、「細胞の基質合成機能を模倣することによりコラーゲンの配向を制御した人工基質を合成（Bio-inspired合成）する技術を開発し、安全な魚類コラーゲンを材料とした生体機能修復材料（人工骨や人工角膜など）として実用化する」ことである。プロジェクトは基礎研究・養殖技術開発・実用化研究の3つのカテゴリーに分類できる。本申請課題は、プロジェクトの「基礎研究」を強力に推進するためのものである。その目的は魚類の鱗再生

機構を研究し、その物性を特徴づけるコラーゲンの高次配向の制御機構を解明して、人工基質のBio-inspired合成へのヒントを提供すること、そして、強磁場下で魚類コラーゲンを線維化させるなど、線維化する時の物理化学的環境を制御することで、魚類コラーゲンの配向制御をおこなうこと、である。

## 3. 研究の方法

(1) 鱗細胞培養のための幹細胞探索とその分化機構の解明：鱗の再生に関与する細胞、特に配向性の高いコラーゲンを産生する線維層板産生細胞の幹細胞とその分化の分子機構を解明する。

(2) 鱗におけるコラーゲン配向機構の解明：コラーゲンの配向決定には短鎖コラーゲンや非コラーゲンタンパクが関与すると予想される。鱗、特に角膜様高次配列コラーゲンを形成する線維層板に含まれるこれらタンパクを可能な限り同定する。その機能を探索してコラーゲンの物性を決定づけるkeyタンパク分子の特定につなげる。

(3) 魚類コラーゲンの物性制御機構の解明—鱗のI型コラーゲン遺伝子の同定とその発現調節機構：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) 再線維化におけるコラーゲン線維配向構造の構築と材料物性：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。透明コラーゲンシートの作製・物性解明を目指す。

(5) 再線維化コラーゲンの高密度化：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。本研究では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。

## 4. 研究成果

(1) 高等脊椎動物の子靴が細胞分化因子であるRunx2, Runx2二より産生が刺激される骨基質タンパク質SPARCおよびBGPをキンギョでクローニングした。定量PCR系を確立し、再生過程におけるmRNA発現変動を定量し、これら分子のmRNA発現量が再生にともない増加し、7~14日目にピークとなることを確認した。また、再生過程における*in situ*

hybridizationにより鱗形成細胞の前駆細胞の存在を明らかにした(図1)。

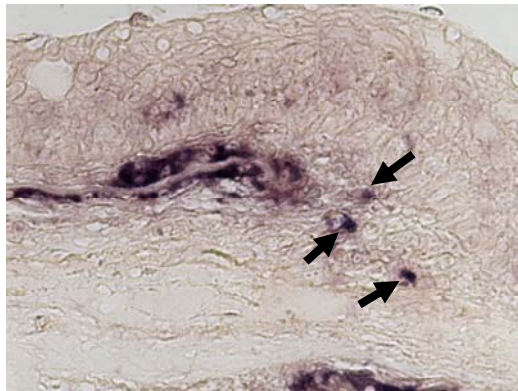


図1 再生鱗における Rux2 の発現 (in situ hybridization)。矢印は鱗周辺の分化途中の前駆細胞と思われる細胞

これらの結果から、鱗の骨質層形成細胞、線維層板形成細胞の分化は、ともに高等脊椎動物骨芽細胞の分化と基本的に同じメカニズムで制御されることを明らかにした。

(2) 線維層板に含まれる非コラーゲン性タンパク質を抽出し、コラーゲンとの結合性が強い画分と弱い画分に分けることに成功した。また、精製に最もじゃまとなるコラーゲンの分離に成功した。コラーゲンとの結合性の弱い画分から sid4 を同定し、sid4 mRNA がゼブラフィッシュおよびキンギョの再生鱗で発現していることを RT-PCR で確認した。sid4 はゼブラフィッシュで最初に報告された細胞外マトリクスで、細胞接着ドメインを4つ持ち、周囲の細胞外マトリクスとのインタラクションが推定されるタンパク質であるが、その機能はいまだ明らかになっていない。鱗における機能について詳細に調べる必要が生じた。sid4 にドメイン構造の似た基質蛋白質にヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)がある。RT-PCRにより、HSPG mRNA もゼブラフィッシュの再生鱗で発現していることを確認した。sid4 に加え、HSPG のウロコにおける機能に関しても今後研究を進める必要が生じた。

(3) キンギョの I 型コラーゲン  $\alpha 1\sim 3$  鎖の cDNA クローニング後、定量 PCR 系を開発し、鱗、皮膚、浮き袋、腸における発現量を定量した。その結果、組織により  $\alpha 1\sim 3$  鎖の発現比率が異なることを解明した(図2)。 $\alpha$  鎖の組合せの違いによってコラーゲン分子中のプロリン残基の量が異なることから、プロリン残基によってもたらされる分子構造の安定性が組織ごとに異なり、結果として変性温度をはじめとするコラーゲンの性状も組織ごとに異なる可能性が示された。

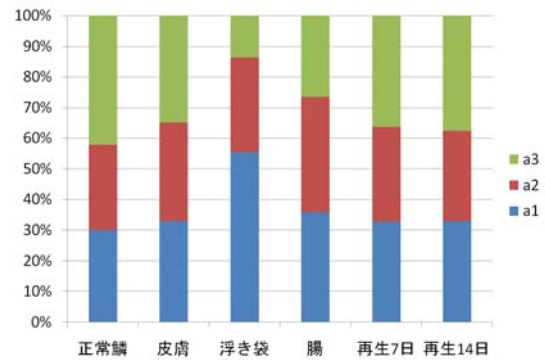


図2 コラーゲン  $\alpha$  鎖 mRNA 発現比率の組織による違い

(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。

## 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10件)

- ① Sugiura H, Yunoki S, Kondo E, Ikoma T, Tanaka J, Yasuda K, In vivo biological responses and bioresorption of tilapia scale collagen as a potential biomaterial, Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, in press. 査読有
- ② 小暮亮雅、粉川良平、藤井岳直、紋川亮、生駒俊之、竹村太郎、花形信孝、田中順三、ナノサーチ顕微鏡による細胞外マトリクスの観察、島津評論、64(3・4): 131-136, 2008. 査読無
- ③ Ohira Y, Shimizu M, Ura K, Takagi Y, Scale regeneration and calcification in the goldfish *Carassius auratus*: quantitative and morphological process. Fisheries Science, 73: 46-54, 2007. 査読有
- ④ Takagi Y, Ura K, Teleost fish scales: a unique biological model for the fabrication of materials for corneal stroma regeneration. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 7: 757-762, 2007. 査読有
- ⑤ 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
- ⑥ Yunoki S, Ikoma T, Monkawa A, Marukawa

- E, Sotome S, Shinomiya K, Tanaka J, Three-dimensional porous hydroxyapatite/collagen composite with rubber-like elasticity, Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 18(4): 393-409, 2007. 査読有
- ⑦ Hanagata N, Takemura T, Monkawa A, Ikoma T, Tanaka J, Phenotype and gene expression pattern of osteoblast-like cells cultured on polystyrene and hydroxyapatite with pre-adsorbed type I collagen, Journal of Biomedical Materials, Part A, 83A(2): 362-371, 2007. 査読有
- ⑧ 生駒俊之、花方信孝、利根川亨、吉岡朋彦、田中順三、ホメオスタシスを調整する生体無機材料、マテリアルインテグレーション、20 (11) : 14-19, 2007. 査読無、招待執筆
- ⑨ Monkawa A, Ikoma T, Yunoki S, Ohta K, Tanaka J, A dewetting process to nano-pattern collagen on hydroxyapatite, Materials Letters, 60(29-30): 3647-3650, 2006. 査読有
- ⑩ 生駒俊之、柚木俊二、田中順三、うろこコラーゲンをういた角膜再建材料への展開、高分子 7月号、55(7): 506, 2006. 査読有

[学会発表] (計16件)

- ① Iimura, K, Tohse H, Ura K, Takagi Y, Expression pattern of Runx2 and SPARC during scale regeneration in goldfish, The 21st Century COE program 7<sup>th</sup> International Symposium “Innovative Marine Science for Tree Es, Edibles, Environment and Education in 21st Century”, November 17, 2008, Conference Hall, Hokkaido University Sapporo Campus, Sapporo, Japan.
- ② Takagi Y, Ohira Y, Ogawa N, Iimura K, Tohse H, Ura K, Teleost fish scale is a unique model for studying regeneration of dermal skeletons, Gordon Research Conference “Bones and Teeth,” July 15, 2007, University of New England, Biddeford, ME, USA.
- ③ Iimura K, Tohse H, Ura K, Takagi Y, mRNA expression patterns of BMP2, Runx2 and SPARC during scale regeneration in goldfish, Gordon Research Conference “Bones and Teeth,” July 15, 2007, University of New England, Biddeford, ME, USA.
- ④ Takagi Y, Hard tissue research and application in aquatic animals, The 6th International Symposium, “Symposium

on Development of Fisheries Science in Asia”, 21st Century COE Program, Marine Bio-Manipulation, Frontier for Food Production, December 18, 2006, Shanghai Fisheries University, Shanghai, People’s Republic of China.

- ⑤ Takagi Y, Tohse H, Ura K, Potential application of fish scale collagen in tissue engineering, 7th Korea-Japan, Japan-Korea Joint Symposium on Aquaculture, October 20, 2006, National Fisheries Research and Development Institute, Busan, Korea.
- ⑥ Iimura K, Tohse H, Ura K, Takagi Y, 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, 2006, National Fisheries Research and Development Institute, Busan, Korea.

## 6. 研究組織

### (1) 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： 1 0 2 1 2 0 0 2

### (2) 研究分担者

浦 和寛 (URA KAZUHIRO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・助教

研究者番号： 9 0 3 6 0 9 4 0

生駒 俊之 (IKOMA TOSHIYUKI)

独立行政法人物質・材料研究機構・生体材料研究センター

研究者番号： 2 0 3 7 0 3 0 6

### (3) 連携研究者

なし