

平成 21 年 6 月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18780253

研究課題名 (和文) コラーゲンゲル薄膜を用いたラクトフェリン徐放化細胞培養担体の開発

研究課題名 (英文) Development of collagen membrane with slow release of lactoferrin

研究代表者

高山 喜晴 (TAKAYAMA YOSHIHARU)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所畜産物機能研究チーム・主任研究員

研究者番号：00343989

ラクトフェリンは骨芽細胞の分化を促進する機能を持ち、骨形成を促進するサイトカインとして再生医療への利用が期待される。このためには、有効濃度のラクトフェリンを骨芽細胞に持続的に供給するドラッグ・デリバリー・システム (DDS) の開発が必要である。Ⅱ型コラーゲンは骨組織を構成する主要な細胞外マトリックスであると同時に、様々な細胞増殖因子を内包し、徐放する性質を持つことが知られている。そこで、Ⅱ型コラーゲンが骨芽細胞分化の過程において、ラクトフェリンの徐放担体として利用可能か検討するため、ウシラクトフェリンを含有するⅡ型コラーゲンゲル薄膜を作成した。この薄膜上でMG63 ヒト骨肉腫由来細胞を単層培養し、デキサメサゾン添加により骨芽細胞に分化誘導すると、ラクトフェリンを含まないコラーゲンゲル薄膜と比較してアルカリフォスファターゼの活性化・オステオカルシンの産生などの分化形質の発現とマトリックスの石灰化 (カルシウムの沈着) が促進された。この結果より、Ⅱ型コラーゲンゲル薄膜がラクトフェリンの徐放担体として培養骨組織の形成に有用であることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：境界農学

科研費の分科・細目：応用分子細胞生物学

キーワード：ラクトフェリン・コラーゲン薄膜・骨芽細胞分化・ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

再生医療とは、培養細胞の増殖・分化能力を活用して組織を人工的に構築し、外傷や疾患のために失われた組織を回復させる技術である。再生医療による組織再生を効率的に行うためには、細胞の足場となる物質と、細胞の増殖・分化を促進するサイトカインの両者を同時に細胞に供給する必要がある。Ⅰ型コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分

であり、生体適合性が高く、取扱いが比較的容易であることから、再生医療において、細胞の足場物質として広く用いられている。

ラクトフェリンは乳中に多く含まれる鉄結合性の糖蛋白質である。強力な抗菌活性・抗真菌活性・抗ウイルス活性を持つことから、免疫系が未発達な新生児の生体防御に寄与しているとされてきた。一方、ラクトフェリンは好中球からも分泌され、血球系細胞や間

葉系細胞の増殖・分化を制御する機能を持つことが知られている。近年、ラクトフェリンが骨芽細胞の増殖・分化を促進し、破骨細胞の骨吸収能を抑制する新たな機能を有することが発見されている。

骨組織の再生医療においては、骨芽細胞分化を促進するサイトカインとして骨形成蛋白質 (BMP) や線維芽細胞増殖因子 (FGF) が使用されてきた。しかし、現時点ではヒトの移植に用いる培養骨を形成するためには、多量のサイトカインが必要であり、患者の経済的な負担が大きい。そこで、ラクトフェリンの骨芽細胞分化を促進する活性を利用し、骨組織の再生を促進するサイトカインとして利用が期待される。

2. 研究の目的

組織再生を促進するサイトカインとしてラクトフェリンを利用するためには、有効濃度のラクトフェリンを目的の部位に必要なだけ供給するドラッグ・デリバリー・システム (DDS) の確立が必要不可欠である。I型コラーゲンは、骨組織を構成する主要な細胞外マトリックスであるのみならず、生体内で様々な細胞増殖因子を内包し、徐放する性質を持つ。そこで、ラクトフェリンをコラーゲンゲル薄膜に含有させることで徐放化を可能にした機能性細胞培養担体を開発し、その骨形成促進効果を実証することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨肉腫細胞株 MG63 の骨芽細胞分化系を用いたウシラクトフェリンの骨芽細胞分化促進の検証

① MG63 細胞 (ヒューマンリソース遺伝子資源バンク) を I 型コラーゲンでコートした 35mm ポリスチレンディッシュまたは同種のディッシュに挿入した I 型コラーゲンゲル薄膜 (ATG テクノグラス: 面積 8.5cm^2) に 2×10^5 [cells/well] の密度で播種し、10%FBS、非必須アミノ酸溶液 (シグマ) を添加した MEM 培養液 (シグマ) で培養した。

② 接触阻害により MG63 細胞の増殖が完全に停止した後、培養液を 100nM デキサメサゾンを含むカルシウム強化 MEM 培養液に置換して骨芽細胞分化を誘導した。同時に濾過滅菌したウシラクトフェリン溶液を最終濃度 $1\mu\text{M}$ で培養液に添加した。培養液は 2 日毎に交換した。

③ 分化誘導後、1 週間毎にマトリックスに沈着したカルシウムを 10%ギ酸で可溶化し、カルシウム C テストワコー (和光純薬) を用いて比色定量した。細胞を 3.7% ホルムアルデヒドで 10 分間固定した後、アリザリンレッド溶液 (純正科学) で染

色することにより結晶化カルシウムを可視化した。

④ 前述のギ酸抽出液をゲル濾過 PD-10 カラム (GE ヘルスケアバイオサイエンス) により脱塩し、凍結乾燥した。粉末を純水に再溶解後、ELISA 法によりオステオカルシン量を測定した。

⑤ アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性は、細胞を 0.2%Triton X-100 で可溶化し 0.1M 炭酸カルシウム緩衝液 (pH9.8) で 37°C でインキュベートし、パラニトロフェニルリン酸 (PNPP) から生成されるパラニトロフェノール (pNP) を 405nm で比色定量することで測定した。1 分間に 1 nmol の pNP を生産する酵素活性を 1 ユニットと定義した。

⑥ Smad2 のリン酸化は、細胞を 1%NP-40・1mM EDTA を含む 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6) で可溶化し、抗 Smad2/3 抗体およびリン酸化 Smad2 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、そのリン酸化の程度を評価した。

(2) I 型コラーゲンゲル・ゼラチンハイドロゲルからのラクトフェリン徐放性の検討

① I 型コラーゲンゲル薄膜および酸性ゼラチンハイドロゲル・塩基性ゼラチンハイドロゲル (メドジェル) 10 mg に、濾過滅菌済みのウシラクトフェリン溶液 (10mg/ml: フォンテラ・ジャパン) を $100\mu\text{l}$ 滴下し、48 時間 4°C で風乾することで吸着させた。

② コラーゲンスポンジまたはゼラチンハイドロゲルを 1ml の PBS が入ったポリスチレンチューブに入れ 37°C でインキュベーションした。一定時間毎に PBS を新しい PBS と全量置換し、PBS 中のラクトフェリン量をサンドイッチ ELISA 法により定量した。

(3) ラクトフェリン含有 I 型コラーゲンゲル薄膜による骨芽細胞分化の促進

① ウシラクトフェリンを 10mg/ml の濃度で純水に溶解後、濾過滅菌した。 $50\text{-}100\mu\text{l}$ を I 型コラーゲン薄膜上に塗布し、48 時間 4°C で風乾することでコラーゲンゲル薄膜に吸着させた。

② ウシラクトフェリン溶液を吸着させた I 型コラーゲンゲル薄膜 (面積 8.5cm^2) 上に MG63 細胞を 2×10^5 [cells/well] の密度で播種し、細胞がコンフルエントに達して完全に増殖が停止した後、培養液を 100nM デキサメサゾンを含むカルシウム強化 MEM 培養液に置換して骨芽細胞分化を誘導した。培養液は 2 日毎に交換し、3 週間培養を継続した。

(4) 統計処理は Welch の t 検定を用い $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) ヒト骨肉腫細胞株 MG63 の骨芽細胞分化系を用いたウシラクtofフェリンの骨芽細胞分化促進の検証

- ① 培養液へのラクtofフェリンの添加（最終濃度 $1\mu\text{M}$ ）により、分化誘導開始から3週間後にラクtofフェリン非存在下と比較して、細胞外マトリックスの石灰化が促進されていた（図1 A）。
- ② 後期骨分化のマーカー蛋白質であるオステオカルシンの産生も同様に促進されていた（図1 B）。
- ③ ラクtofフェリン添加により、分化誘導開始2週間後および3週間後に、骨芽細胞分化に伴うアルカリフォsfターゼ活性が上昇していた（図1 C）。また、

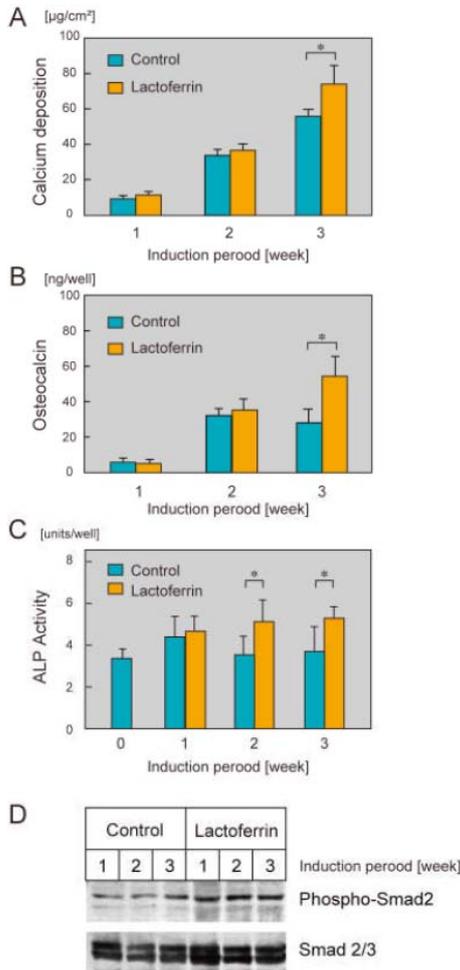


図1 ラクtofフェリンによる MG63 細胞の骨芽細胞分化の促進。ラクtofフェリン存在および非存在下において、分化誘導開始後1-3週間後のカルシウム沈着量 (A) オステオカルシン産生量 (B) アルカリフォsfターゼ活性 (C) および Smad2 リン酸化レベル (D) を比較 * $p < 0.05$.

Smad2 のリン酸化レベルの上昇が認められた（図1 D）。

(2) I型コラーゲンゲル・ゼラチンハイドロゲルからのラクtofフェリン徐放性の検討

- ① I型コラーゲンゲル薄膜の場合、PBS とインキュベーション開始12時間でゲル薄膜に含まれるラクtofフェリンの約27%が、6日後に約32%が培養液中に放出された。（図2）
- ② 酸性ゼラチンハイドロゲル (pI=5.0) の場合、12時間後にゲルに含まれるラクtofフェリンの約55%が、6日後に約60%が放出された。塩基性ゼラチンハイドロゲル (pI=9.0) の場合、12時間後にゲルに含まれるラクtofフェリンの約25%が、6日後に約30%が放出された。（図2）
- ③ 酸性ゼラチンハイドロゲルからのラクtofフェリンの累積放出量が最大であり、ラクtofフェリンの徐放担体としてより、適していると考えられた。

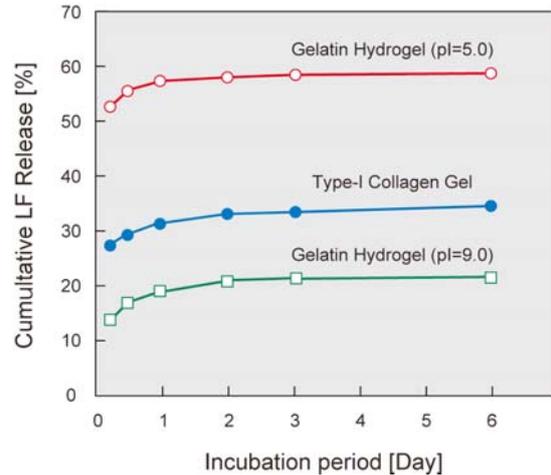


図2 I型コラーゲンゲル薄膜および酸性・塩基性ゼラチンハイドロゲルからのラクtofフェリンの放出パターン

(3) I型コラーゲンゲル薄膜コラーゲンゲル薄膜による骨芽細胞分化の促進

- ① I型コラーゲンゲル薄膜上で MG63 細胞に骨芽細胞分化を誘導すると、I型コラーゲンでコートしたディッシュ上で分化誘導した場合と比較し、分化誘導開始後2週間後の時点において、コラーゲンの石灰化が促進されていた（図3 A）。
- ② I型コラーゲンゲル薄膜上では、I型コラーゲンコートしたディッシュ上と比較して、アルカリフォsfターゼの活性化がより顕著であった（図3 B）。
- ③ 培養液中へのウシラクtofフェリンの添加（最終濃度 $1\mu\text{M}$ ）により、コラーゲンの石灰化・アルカリフォsfターゼ

活性の上昇がラクトフェリンを含まない I 型コラーゲンゲル上に播種した細胞と比較して亢進していた。

- ④ これらの結果から骨芽細胞分化の過程において、I 型コラーゲンゲル薄膜がたんに骨芽細胞の足場として機能するばかりでなく、その分化形質の発現を促進する機能を持つことが明らかとなった。

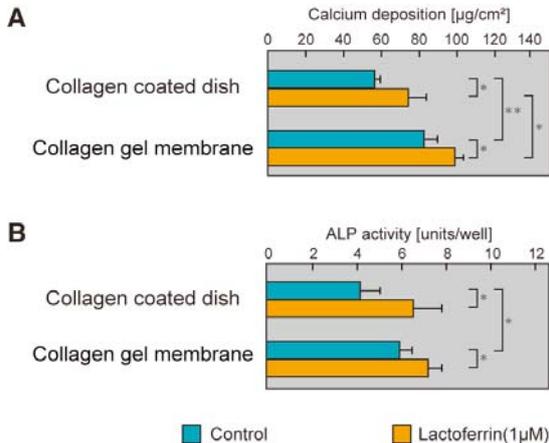


図3 コラーゲンゲル薄膜とラクトフェリンによるMG63細胞の骨芽細胞分化における石灰化 (A) とアルカリフォスファターゼ活性 (B) の促進 * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

(4)ラクトフェリン含有 I 型コラーゲンゲル薄膜による骨芽細胞分化の促進

- ① ラクトフェリン含有 I 型コラーゲンゲル薄膜上に MG63 細胞を播種して、カルシウム強化MEM培養液により骨芽細胞様の細胞に分化誘導したところ、ラクトフェリンを含まないコラーゲンゲル薄膜上で分化誘導した場合と比較してコラーゲンゲル薄膜へのカルシウム沈着 (石灰化) が促進された (図 4 A・B)。
- ② ラクトフェリン含有 I 型コラーゲンゲル薄膜上で骨芽細胞分化を誘導した場合、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が顕著であり、オステオカルシン産生量も増大していた。(図 5 A・B)。
- ③ ゲル薄膜上の細胞のDNA量には両者の間で有意差は認められず、観察された分化形質発現の促進は、細胞の増殖促進によるものではないことが示唆された。
- ④ これらの結果からコラーゲンゲル薄膜から培養液中に放出されたラクトフェリンが、骨芽細胞の分化を促進する活性を維持していることが明らかとなり、I 型コラーゲンゲル薄膜がラクトフェリンの担体として、骨組織の再生医療に有効であることが示された。

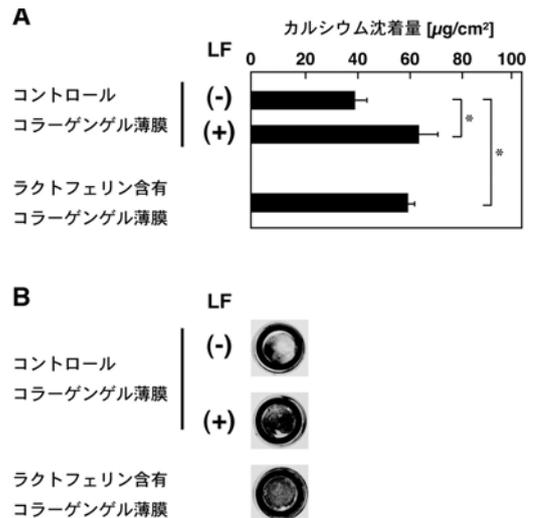


図4 MG63細胞の骨芽細胞分化の過程における石灰化に対するラクトフェリン含有コラーゲンゲル薄膜の効果 (A) コントロールコラーゲンゲル薄膜およびラクトフェリン含有コラーゲンゲル薄膜上に細胞を播種し、骨芽細胞に分化誘導開始2週間後のマトリックスへのカルシウム沈着量を測定した。(B)アリザリン染色により結晶化カルシウムを染色した。* $p < 0.05$.

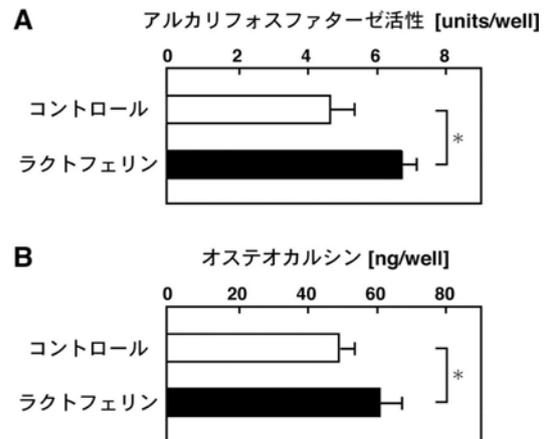


図5 MG63細胞の骨芽細胞分化の過程におけるアルカリフォスファターゼ活性 (A) およびオステオカルシン産生 (B) に対するラクトフェリン含有コラーゲンゲル薄膜の効果 * $p < 0.05$.

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7件)

- ① Yoshiharu Takayama and Koko Mizumachi. Effect of lactoferrin embedded collagen membrane on osteogenic differentiation of humanosteoblast-like cells. J. Biosci.Bioeng. 107, 191-195 (2009) 査読 (有)
- ② 高山喜晴 ウシラクトフェリンと骨芽細胞による骨様組織の形成ブレインテクノロジー 130,6-9 (2008)査読 (無)
- ③ 高山喜晴 ウシラクトフェリンによる骨芽細胞の分化促進と骨組織再生への応用 畜産技術 639, 2-6 (2008)査読 (無)
- ④ Yoshiharu Takayama and Koko Mizumachi.. Effect of bovine lactoferrin on the extracellular matrix calcification by human osteoblast-Like cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72, 226-230 (2008) 査読 (有)
- ⑤ Toshiaki Takezawa, Tomoyo Takeuchi, Aya Nitani, Yoshiharu Takayama, Masahiro Kino-oka, Masahito Taya and Shin Enosawa. Collagen vitrigel membrane useful for paracrine assays in vitro and drug delivery systems in vivo. J. Biotechnol. 131, 76-83 (2007) 査読 (有)
- ⑥ Toshiaki Takezawa, Aya Nitani, Tadashi Shimo-Oka and Yoshiharu Takayama. Protein-permeable scaffold of acollagen vitrigel membrane useful for reconstructing epithelial mesenchymal models. Cells Tissues Organs 185,237-241(2007) 査読 (有)
- ⑦ Yoshiharu Takayama and Toshiaki Takezawa. Lactoferrin promotes the collagen gel contractile activity of fibroblasts mediated by lipoprotein receptors. Biochem. Cell Biol. 84, 268-274 (2006) 査読 (有)

[学会発表] (計6件)

- ① 高山喜晴、水町功子 ウシラクトフェリンを含有するコラーゲンゲル薄膜による骨芽細胞分化の促進 第3回ラクトフェリンフォーラム 2008年11月30日 学術総合センター
- ② Yoshiharu Takayama and Koko Mizumachi. Bovine lactoferrin immobilized on collagen membrane promotes differentiation of human osteoblast-like cells. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 2008年7月2日 メガロンアテネ国際会議センター (ギリシャ)
- ③ 高山喜晴、水町功子 コラーゲンゲル薄膜を用いたラクトフェリンの徐放化によ

る骨芽細胞分化の促進第1回・歯周病ラクトフェリンフォーラム 2008年4月27日 大宮ソニックシティ

- ④ 高山喜晴、水町功子 ラクトフェリンのヒト骨芽腫細胞株の骨芽細胞分化および石灰化に対する効果第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 2007年12月14日 パシフィコ横浜
- ⑤ Yoshiharu Takayama and Koko Mizumachi. Modulated-release of bovine lactoferrin from collagen membrane and application for bone tissue engineering. The 8th international actoferrin conference. 2007年10月23日 ボスコロプラザホテル ニース (フランス)
- ⑥ 高山喜晴、水町功子 ヒト骨肉腫細胞株の骨芽細胞分化および石灰化に対するウシラクトフェリンの効果と骨組織再生への応用日本動物細胞工学会 2007年度大会 2007年7月4日 高崎シティーギャラリー

[図書] (計1件)

高山喜晴、竹澤俊明 日本医学館、ラクトフェリン 2007、84-88.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 喜晴 (TAKAYAMA YOSHIHARU)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所畜産物機能研究チーム・主任研究員
研究者番号：00343989

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし