

令和 3 年 8 月 20 日現在

機関番号：82670

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12092

研究課題名（和文）プロテオグリカンを複合したコラーゲン高次階層バンドルの創製とその生体内再構築機序

研究課題名（英文）Development of highly hierarchical bundles comprising of collagen and proteoglycan and their in vivo evaluations

研究代表者

柚木 俊二（Yunoki, Shunji）

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部開発第二部バイオ応用技術グループ・上席研究員

研究者番号：20399398

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：先行研究で開発した配向コラーゲン線維ゲル連続成型技術を用いて、細胞侵入経路を持つコラーゲン/コンドロイチン硫酸（Chs）複合人工腱を開発した。幅3 mm、厚さ2 mmの棒状の人工腱を、家兔の膝蓋腱中央に作製したスリットへ埋植した。6週後には人工腱の大半が吸収され、腱のコラーゲン組織に置換されていた。6週から12週にかけてヤング率が減少する傾向を認め、組織再構築が生じたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

・生体の腱は、コラーゲン分子が一軸に配向したナノfibrilが段階的に束化し、fiber<fascicle<bundleへと階層化している。本研究では分子からfascicle段階までの配向コラーゲン階層化を実現した。
・靭帯損傷に対しては、自家腱移植に代わる人工腱が求められている。吸収性を制御した複数のコラーゲン構成物の組み合わせ、人工腱に被リモデリング機能を付与しうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Using our continuous molding technology to fabricate collagen gels of uniaxially aligned fibrils we developed a collagen / chondroitin sulfate (Chs) composite artificial tendon with a cell invasion pathway. A rod-shaped artificial tendon with a width of 3 mm and a thickness of 2 mm was implanted in a slit prepared in the center of the patellar tendon of a rabbit. After 6 weeks, most of the artificial tendon was absorbed and replaced with collagen tissue in the tendon. Young's modulus tended to decrease from 6 to 12 weeks, suggesting that tissue restructuring occurred.

研究分野：生体医工学。特に、生体吸収性材料に関する。

キーワード：コラーゲン 人工腱 靭帯 配向 生体吸収性

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界初の被リモデリング機能を有する人工腱の創製に向けて

① 人工腱・靭帯の創製を目指し、生体材料学ではコラーゲン fibril 配向化および fiber 成型法が研究されてきた。しかし、ほぼ無配向な fiber が成型される湿式紡糸が長年に渡り踏襲され (Shepherd. J Biomed Mater Res A 2013;101:176)、最新の電気化学的手法も低線維配向かつ fiber 径の制御が困難な成型法に留まっていた (Younesi et al. Adv Funct Mater 2014;24:5762)。

② この現状を打破するため、研究代表者らは科研費基盤 C の補助を受け、わずか 1~10 s⁻¹ の切断速度により、コラーゲン線維が高度に全層配向したゲルを作製する新規手法を開発し、その配向化機序を解明した (Yunoki et al. JBMR A 2015;103:3054)。更に、この機序をもとに、コラーゲン線維が高度かつ全層配向したゲル fiber の連続成型およびそのサイズ・形状制御に世界に先駆けて成功した (図 1 : 特願 2017-215184、Yunoki et al. JBMR A submitted)。

③ 最終目的である世界初の被リモデリング機能を有する人工腱の創製に向けて、これまでの成果を格段に発展させるための最大の学術的挑戦は、fiber 間が PG で架橋された高次構造を有する人工腱 fascicle を創製することにある。

(2) 人工腱の生体内リモデリング現象の評価と機序の解明

① これまで研究されてきた人工腱・靭帯とは、初期強度のみが高い人工線維束であり、生体内で再構築が起こらないが故に早期の断裂が不可避であった (Chen et al. Expert Rev Med Devices 2009;6:61)。

② このため、侵襲性が高い自家腱移植が靭帯再建術の標準的手法となっている。自家腱は移植部位で組織再構築機転を受け、構造と強度が経時的に変化するが、天然の腱の主構造である階層化コラーゲン配向構造の役割は不明のままである。

③ 本研究により人工コラーゲン bundle が創製されるため、「階層化コラーゲン配向構造と fiber 間の PG 架橋構造を有する人工コラーゲン bundle が、天然の腱と同様の細胞浸潤性を示しつつ組織再構築現象を生じるか？」という問いに対し、本研究は解を与える。その結果は、生命科学領域における中心的学術テーマである、生体における腱・靭帯組織の機能的適応制御機構の解明に貢献することになる。

2. 研究の目的

- ・一軸配向構造を持つ fiber 間が PG で架橋された高次構造を有する人工 fascicle を創製する。
- ・不均一径の fascicles に 3 次元構造を与えて人工腱 bundle を創製し、すでに確立した in vivo 実験系 (家兎埋植実験) に用いて、この bundle に起こる生体内再構築現象を生体力学および分子生物学的に評価する

3. 研究の方法

(1) 人工腱コンポーネントの作製

① 緻密コラーゲン紐の作製 J Biomed Mater Res B 2018 に記載の方法により、2.5%コラーゲンゾルから 13G のステンレス管を通して紐状コラーゲンゲルを吐出させた。その後、段階的エタノール置換を行い、風乾して直径約 200 μm の緻密コラーゲン紐を得た。

② 緻密コラーゲン帯の作製 ステンレス管を断面が 1 mm×25 mm、長さ 100 mm の流路を持つステンレス金型に置き換えたことを除き、緻密コラーゲン紐の作製と同じ方法で帯状コラーゲンゲルを得た。同様に段階的エタノール置換を行い、風乾して緻密コラーゲン帯を得た (図 1 A)。間隔 400 μm の 15 連カッターを用いて無数のスリットを帯に形成させた (図 1 B)。

(2) 人工腱の作製

① 緻密コラーゲン紐 (直径 約 200μm) 2 本の撚り紐を作製し、両端を玉結びにより固定して全長 50 mm とした (図 1 C)。脱水熱架橋 (DHT; 110°C、6 h) を施してコラーゲンを不溶化した。・同様に DHT を施した緻密コラーゲン帯 (25 mm×50 mm) を、DHT を施した。中性コラーゲン/Chs 混合ゾルに浸漬し、凍結乾燥によりコラーゲン/Chs 多孔質 - 緻密コラーゲン - コラーゲン/Chs 多孔質のラミネート構造を作製した。同様に、中性コラーゲンゾルに浸漬し、コラーゲン多孔質 - 緻密コラーゲン - コラーゲン多孔質のラミネートシートを作製した (図 1 D)。

② DHT を施した緻密コラーゲン撚り紐を軸とし、エタノールで swelling したラミネートシートを巻き付け、シリコンゴムを型として凍結し、凍結乾燥した (図 1 E)。

③ 130°C、2 h の DHT を施し、動物実験へと供した。作製した 3 種類の人工腱を表 1 に示す。

表 1 作製した 3 種類の人工腱

ID	サイズ	細胞・組織侵入経路 (スリット)	マトリクス
6a	3 mm×2 mm×50 mm	あり	コラーゲン/Chs
6b	3 mm×2 mm×50 mm	なし	コラーゲン/Chs
6c	3 mm×2 mm×50 mm	あり	コラーゲンのみ

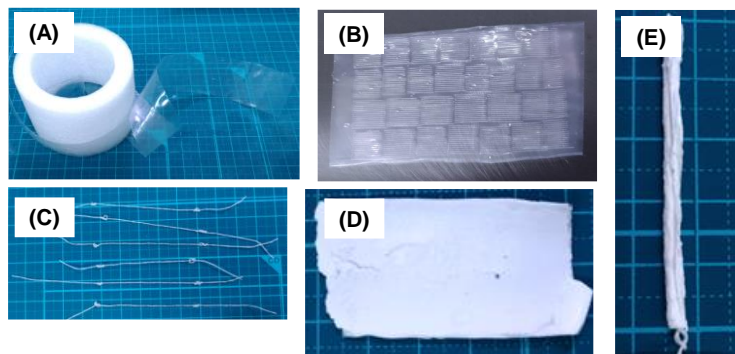


図1. 人工腱コンポーネントおよび人工腱の外観。
A、緻密コラーゲン帯； B、無数のスリットを付与した緻密コラーゲン帯； C、緻密コラーゲン紐2本の撚り紐； D、コラーゲン/ChS と B とのラミネートシート； E、人工腱。

(3) 人工腱の埋植前評価

- ①断面構造 メス刃で人工腱を切断して長さ方向と垂直な断面を作製し、金コーティングを施した後、走査型電子顕微鏡 (SEM) により形態観察を行った。
- ②Chs 複合化 ミクロトームで人工腱を切断して長さ方向と垂直な断面を作製し、スライドガラスに乗せた後にトルイジンブルー染色を行った。正立顕微鏡でコラーゲン (青緑) と Chs (紫) の分布を観察した。
- ③力学試験 テクスチャー試験機により、人工腱の引っ張り試験を行った。人工腱を 37°C の PBS に 6 時間浸漬して十分に膨潤させた後、両端をグリップで把持して速度 1 mm/s にて引っ張った。応力 - 歪曲線からヤング率と破断応力を求めた。

(4) 動物実験

①家兎膝蓋腱への埋植実験

日本白色ウサギ (体重 3.5 ± 0.2 kg; 20 週令以上) の膝蓋腱に幅 3 mm のスリットを開け、コラーゲン人工腱を埋植・縫合固定した。所定期間後 (6 週、12 週)、大腿骨 - 膝蓋 - 膝蓋腱 - 脛骨複合体を採取した。

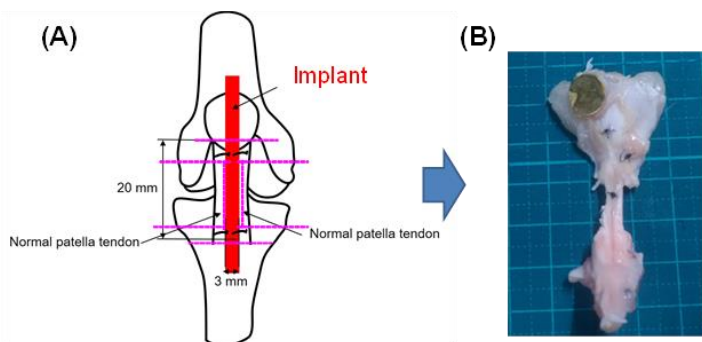


図2. 家兎膝蓋腱への埋植実験の模式図 (A) および摘出後の大腿骨 - 膝蓋 - 膝蓋腱 - 脛骨複合体の外観 (B)。

②組織観察

摘出した膝蓋腱のヘマトリキシン - エオシン (HE) 染色および組織観察を、常法に従って実施した。

③生体力学評価

エアチャックを装備した自動強伸度試験機 (RTC-1210、オリエンテック社製) を用いて、膝蓋腱の引っ張り試験を行った。摘出した大腿骨 - 膝蓋 - 膝蓋腱 - 脛骨複合体の膝蓋腱周囲の滑膜、筋肉、および脂肪等の周囲組織をメス刃で除去し、膝蓋腱の中央部に幅 4~7 mm のくびれ部を作製した (図 2 B)。くびれ部の幅、厚さ、および長さをノギスで計測した。サンドペーパーを介して大腿骨および脛骨をエアチャックで把持し、速度 1 mm/s で引っ張り試験を行った。(3) ③と同様にヤング率と破断応力を求めた。

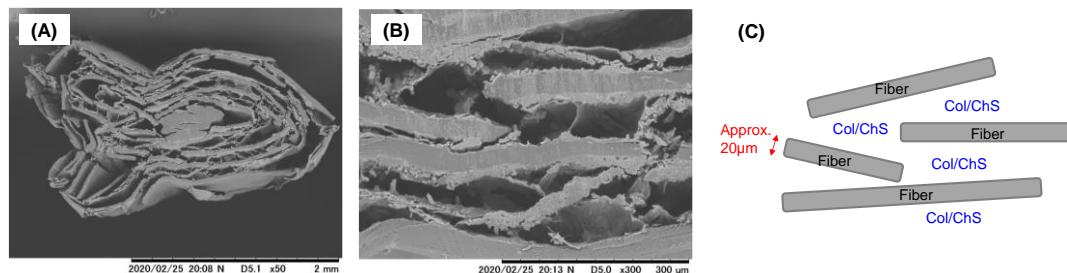


図3. 人工腱 6a の SEM 像。
A、断面； B、断面の拡大； C、断面構造の模式図。

4. 研究成果

(1) 人工腱の構造

人工腱 6a の断面の SEM 像を図 3 に示す。無数のスリットを付与した緻密コラーゲン帯を撚り紐を軸としてロールアップしたことにより (図 3 A)、分離した帯それぞれがファイバーとなり、半径方向に連通路が確保されていた (図 3 B)。模式的には図 3 C のような構造を有していた (Chs の存在については後述)。一方、表面から観察すると、幅が約 400 μm の板が隙間を有しながら重なり合っていた (図 3 D)。模式的には図 3 E のような構造を有していた。

トルイジンブルー染色した断面観察により、Chs とコラーゲンの複合体がファイバー間を充填していることが明らかにされた (データは示さない)。以上の結果から、開発した人工腱 6a は半径方向に細胞・組織の侵入が期待される連通路を有し、コラーゲン/ChS 複合体をマトリクスとしていることを確認した。

(2) 人工腱の力学特性

引っ張り試験により、膨潤した人工腱 6a のヤング率は 2.54 ± 0.87 MPa、破断応力は 0.500 ± 0.156 MPa と求められた。

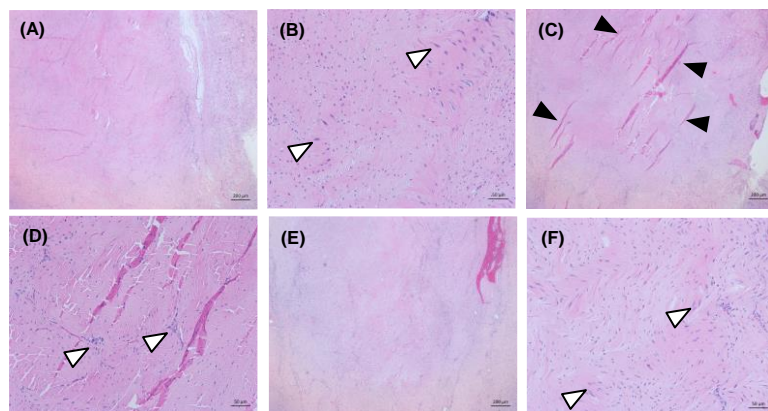


図 4. 人工腱 3 種類を埋植した家兎膝蓋腱の 6 週後の HE 染色像。
A、人工腱 6a； C、人工腱 6b； E、人工腱 6c. B、D、および F はそれぞれ A、C、および E の拡大像. 黒矢印、残存していたコラーゲンファイバー； 白矢印、肥大した卵型の細胞。

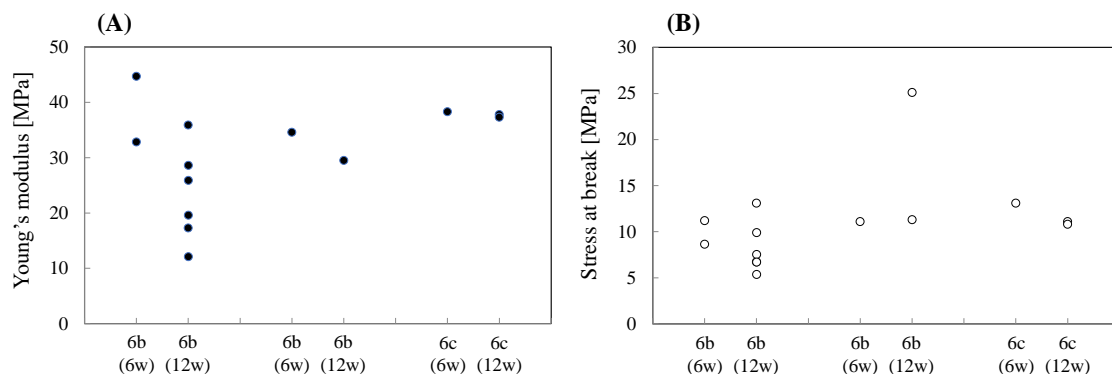


図 5. 人工腱 3 種類を埋植した家兎膝蓋腱の 6 週後の HE 染色像。

A、人工腱 6a； C、人工腱 6b； E、人工腱 6c. B、D、および F はそれぞれ A、C、および E の拡大像. 黒矢印、残存していたコラーゲンファイバー； 白矢印、肥大した卵型の細胞. 各条件で試験数が異なるため、個別のデータをプロットした。

(3) 家兎膝蓋腱への埋植実験

埋植後 6 週に採取した膝蓋腱の HE 染色を図 4 に示す。人工腱 6a および 6c の横断面の HE 染色像には人工腱の残存はほとんど観察されず、大半が吸収されたことが明らかになった。埋植部位の中央部には周囲組織と異なる波打ったコラーゲンモルフォロジーと肥大した ovoid cell が多く観察された。人工腱の中央部を支持している緻密なコラーゲンファイバーの生体吸収が 6 週で活発に起こっている一方で、コラーゲンシートおよびマトリクス部はすでに生体吸収されたものと考えられた。ChS の存在による祭は認められなかった。これに対し、人工腱 6b の HE 染色像には緻密コラーゲン帯由来のコラーゲンファイバーが散在した。連通路としてのスリットが存在すると細胞・組織の浸潤が促進され、その結果として 6a および 6c の吸収が早まり、反対に連通路を持たない 6b の吸収が遅延したことが推察された。

生体力学試験の結果を図 5 に示す。人工腱 6a を埋植した膝蓋腱は 6 週から 12 週にかけてヤング率が低下する傾向が見られた。試験数が少なかったので統計的な議論はできないが、人工腱 6b および 6c では 6 週から 12 週にかけてのヤング率の変化は見られなかった。破断応力は、6b の 12 週で特異的に高いデータが 1 点だけ得られたことを無視すると、どの人工腱でもほぼ同じ値が得られ、6 週から 12 週にかけての変化は見られなかった。

本研究で作製した人工腱 6a は 6 週後に大半が吸収され、組織再構築が生じたことが示唆された。今後は吸収性の低い構造体と高い構造体を複合化することにより、組織再構築を生じさせながら強度の経時劣化を抑える人工腱の創出が可能と考えられた。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

以上

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 Yunoki Shunji, Hatayama Hirosuke, Ebisawa Mizue, Kondo Eiji, Yasuda Kazunori	4. 巻 107
2. 論文標題 A novel method for continuous formation of cord like collagen gels to fabricate durable fibers in which collagen fibrils are longitudinally aligned	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 1011 ~ 1023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.34194	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shunji Yunoki, Mizue Ebisawa, Hirosuke Hatayama, Eiji Kondo, Kazunori Yasuda
2. 発表標題 Continuous Fabrication of Collagen Fibers Comprised of Uniaxially Aligned Fibrils: The Second Step for Creating Artificial Tendon that Mimics the Hierarchical Collagen Structure
3. 学会等名 Society for Biomaterials 2018 Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柚木俊二、浦岡俊夫	4. 発行年 2018年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 691
3. 書名 ゲル化・増粘剤の使い方、選び方 事例集	

〔産業財産権〕

〔その他〕

生体高分子の成型法を革新する配向コラーゲン線維ゲルの連続吐出法
www.tosangiken-seika.jp/_pdf/010.pdf

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
研究分担者	海老澤 瑞枝 (Ebisawa Mizue) (00510893)	地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部 開発第一部光音技術グループ・上席研究員 (82670)	
研究分担者	畑山 博哉 (Hatayama Hirosuke) (80614552)	地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部 開発第二部バイオ応用技術グループ・副主任研究員 (82670)	
研究分担者	近藤 英司 (Kondo Eiji) (60374724)	北海道大学・大学病院・教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関