

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22322

研究課題名(和文) 魚類コラーゲンに特徴的なミクロンレベルの大直径線維の成長機構と細胞分化誘導活性

研究課題名(英文) Formation of collagen bundles with micron-order diameter in sturgeon collagen: the mechanism of formation and bioactivity

研究代表者

都木 靖彰 (Takagi, Yasuaki)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：10212002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では魚類コラーゲン(SBC)を用いることで、ミクロンレベルの大直径コラーゲン線維の成長機構を直接観察するためのAFM観察、デジタルマイクロスコブ観察技術、NaCl濃度やPB濃度によるバンドル形成と細い線維の形成の制御技術を開発した。またSBC線維、分子上の細胞の遺伝子発現を変化させる情報の入り口が細胞接着部にある可能性を示した。今後これらの技術を用いることでバンドル形成機構をさらに詳細に検証できる。また、細胞とコラーゲン線維との接着装置であるインテグリンとその後の情報伝達経路を線維と分子で比較することで、線維への接着が遺伝子発現を制御する機構の解明が実現する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は魚類コラーゲンを用いることで生体内のコラーゲンバンドル形成機構を解明し、普遍的生命現象である『コラーゲンバンドルが複雑かつ合理的な構造で組織を3次元的に支え、動物が一定以上のサイズに成長するメカニズム』の本質に迫れる可能性を示した。加えて魚類コラーゲンのバンドルを用いればこれまで実現できなかった高強度コラーゲンマトリクスを用いた「本物の組織」を作る人工マトリクスの実用化につながる可能性を示したもので、人工ポリマーを用いる現在の再生医療のパラダイムシフトを引き起こす可能性を秘める技術である。これに成功すれば、再生医工学において我が国独自の領域を創ることができ、その飛躍的發展も望める。

研究成果の概要(英文)：The micron-order bundles are the morphology of collagen observed in animal bodies and give stiffness to the tissue. Thus, clarifying the bundle formation mechanism will support the development of cellular scaffolds that have the mechanical strength required for tissue engineering. Since mammalian collagens do not form such bundles in vitro, we use the sturgeon collagen, that can form bundles, and developed key technologies, such as high-speed AFM and digital microscopies, which enable us to directly observe the process of micron-order bundle formation in vitro. In addition, the technology to regulate the diameter of collagen fibrils and bundles by changing NaCl and phosphate buffer concentrations, coating collagen bundles or fine fibrils on cell-culture wells, and culturing the cells on the surface were developed. These technologies are powerful tools to further clarify the bundle formation mechanism and the effects of bundles on cellular functions in the future.

研究分野：水産廃棄物の有効活用

キーワード：魚類コラーゲン 大直径コラーゲン線維 組織工学 細胞足場マトリクス 水産加工副生物

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

生体組織において細胞外マトリクスとコラーゲンが持つ機能は、細胞の足場となって組織を力学的に支えるだけではない。コラーゲンの型、線維径、配列状態、粘弾性等の情報は、インテグリンを介して細胞に伝達され、サイトカインとともに細胞の遺伝子発現を調節する (Watt and Huck, Nature Rev Mol Cell Biol, 14, 2013)。また、コラーゲン分子のテロペプチド部分を切断して形成した線維は免疫反応を起こさない。このように、コラーゲン線維は力学的に組織を支えるとともに生物学的に細胞機能を調整し、医学的にも安全であることから、人工マトリクスに最適な原料である。このことから、本課題の分担者である東京都産技研チームはブタコラーゲンをを用いて再生医療用マトリクス合成に有用な様々な技術を開発した。しかし、「複雑かつ合理的な構造を作って力学的・生物学的機能を発揮する」という生体内コラーゲンがもつ本来の役割を再現した人工マトリクスを創出し、再生医療の実用化へと発展させる生命科学的研究は完全に停滞している。その理由は、哺乳類コラーゲンを材料とした場合には人工マトリクスの十分な強度を作り出すために必要なミクロンオーダーの直径を持つ太いコラーゲン線維(バンドル)を *in vitro* では形成できないことにある (現状の技術では哺乳類コラーゲン線維の直径は約 100 nm までしか成長しない、図 1)。一方、研究代表者が所属する北大では高い線維化能力をもつチョウザメ浮袋コラーゲン(SBC)という有望材料を発見し、ミクロンレベルの線維形成(図 1)を実現した。加えて、ミクロンレベルの線維を細胞培養ウェルにコーティングしその上で細胞を培養してコラーゲン線維から細胞に情報を伝達しうる線維コーティング技術や線維ゲルを世界に先駆けて開発した。しかし、この成果を再生医療用マトリクスに実用化するには医用工学との協働が必要であった。そこで両グループが協働し、SBC をモデルとしてミクロンレベルのコラーゲンバンドル形成機構を解明し、その成果を哺乳類由来コラーゲンではなしえない十分な強度を持つ新規マトリクス合成につなげる本研究を提案するに至った。

本研究は魚類コラーゲン SBC を用いて線維の核形成とその後のミクロンレベルのコラーゲンバンドルの形成を生体外で再現してそのメカニズムを解明することで、生体内のコラーゲンバンドル形成機構を解明し、普遍的生命現象である『コラーゲンバンドルが複雑かつ合理的な構造で組織を 3 次元的に支え、動物が一定以上のサイズに成長するメカニズム』の本質に迫るものである。加えて、本課題はこれまでバイオメディカル領域の研究では用いられてこなかった魚類コラーゲンをを用いることで、停滞していた研究に新しい展開をもたらす点で、独創性の高い挑戦的課題である。また、『生体外におけるミクロンレベルの太さを持つコラーゲンバンドルの形成』は、高強度コラーゲンマトリクスの開発につながるものであり、生体内材料であるコラーゲンをを用いた「本物の組織」を作る人工マトリクスの実用化につながるものである。これは、人工ポリマーを用いる現在の再生医療のパラダイムシフトを引き起こす可能性を秘める技術である。これに成功すれば、再生医工学において我が国独自の領域を創ることができ、その飛躍的發展も望める。加えて、魚類コラーゲンをを用いたマトリクスが実用化されれば、水産加工副生物のバイオメディカル領域の高収益型利用が開拓されることとなり、水産業に与えるインパクトも大きい。これまでの水産加工副生物研究のほとんどは食用利用を想定した食機能研究もしくは化粧品利用を想定した研究であり、バイオメディカル材料への利用は副生物利用の方向性を大きく変革・転換するものである。

## 2. 研究の目的

**目的 1** 本課題の第 1 の目的は、チョウザメコラーゲンに特異的な“活発な線維核形成”および“大直径線維成長”の機序を解明することである。それぞれのモデルには SBC と脊索型コラーゲン(NC)混合線維( + ハイブリッド型線維)形成および SBC 単独の線維形成を用い、生体外で線維核形成とバンドルへの成長機構を解明し、生体内でのバンドル形成機構解明の一歩とする。

図 1 *In vitro* で形成されたチョウザメ SBC 線維(上)とブタ腱コラーゲン線維の形態。バーは 5  $\mu\text{m}$ 。Zhang et al., 2014 より引用。

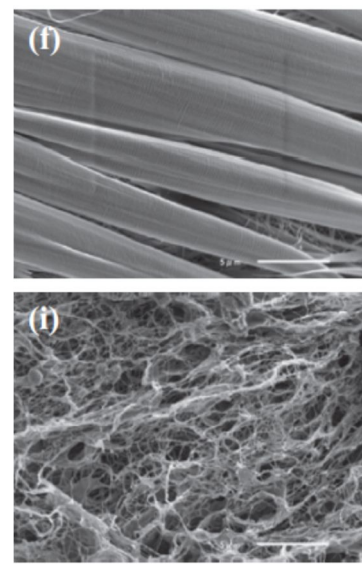
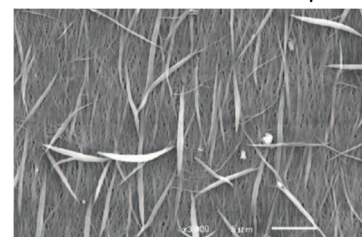


図 2 北大が開発した SBC 線維コートディッシュ。バンドルもコートされている。バーは 5  $\mu\text{m}$ 。



**目的2** 組織工学や再生医療には、細胞の足場となり形成すべき組織の形状や強度を規定する人工マトリクスが用いられる。生体成分であるコラーゲンを用いた人工マトリクスは「本物の組織の構築」につながる技術であるが、*in vitro* で哺乳類コラーゲンが形成する直径 100 nm 前後の線維では力学的に極めて脆く、再生医療への応用は極めて限定されている。本課題の第2の目的は、SBC が作るコラーゲンバンドルの細胞機能活性化能を解明して、水産加工副生物由来コラーゲンが組織工学や再生医療用の高強度のマトリクス合成に応用可能であることを証明することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) + ハイブリッド型線維形成過程の詳細観察（東京都産技研グループ、北大グループ）

北大グループが開発した SBC 線維化技術と都産技研グループの生体材料評価手法を駆使して、SBC 線維形成過程（SBC 分子の集合による核形成、他分子を巻き込んだ核の成長（原線維形成）、原線維同士の融合によるミクロンオーダーのバンドルへの成長）を詳細に観察し、そのメカニズムを解明する。

#### (2) SBC 線維の細胞機能活性化能の実証（北大グループ）

北大グループが開発した SBC 線維を細胞培養用ウェルにコーティングする手法を用い、型線維をコーティングする。株化細胞や間葉系幹細胞を用い、線維が持つ細胞増殖活性と骨芽細胞への分化誘導能力を測定して SBC 線維が細胞の分化誘導に優れていることを証明する。細胞増殖は DNA 量、分化はマイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析およびマーカー遺伝子の qPCR 等により定量的に判定する。

### 4. 研究成果

#### (1) + ハイブリッド型線維形成過程の詳細観察

##### (1a) 超遠心分析による SBC と青紫 型コラーゲン分子 (NC) の解析

超遠心分析方を用いることで、+ ハイブリッド化の検証技術を確立できた。すなわち、超遠心分析により研究に用いる SBC 分子と NC 分子の解析をおこない、どちらもアテロ化がほぼ完全におこなわれた単分子であることを確認すると共に、S 値（超遠心時の移動度）が 0.25 違っており（SBC < NC）両者を超遠心分析で分離して区別できることを示した。

##### (1b) SBC 線維形成過程の分子間力顕微鏡 (AFM) 観察

SBC 線維形成過程の AFM 観察に成功した。酸性溶液中では SBC 分子を太さ約 5 nm、長さ 100 nm ほどに達する糸状の構造物として観察することに成功した。同条件では小粒状の構造物が観察され、その実態は明らかにできなかったが、これはコラーゲン分子同士の絡み合ったもの、もしくは分子が糸鞠状に凝集したものではないかと考えた。コラーゲン線維が形成される中性条件下では、凝集体に長さ 50 nm ほどの SBC 線維が凝集してゆき、約 450 nm の大きさまで凝集体が成長する様子が観察された。この凝集体がバンドルを形成し、SBC に特有のミクロンオーダーの線維を形成する可能性があると考えられるが、それを直接証明することはできなかった。

##### (1c) デジタルマイクロスコープを用いたミクロンオーダーの線維の成長過程観察

東京都産技研が新しく購入した温度制御装置付のデジタルマイクロスコープとコラーゲン線維形成を観察するために制作した特殊治具を用いてミクロンオーダーの線維の成長過程を観察することに成功し、線維形成時の自由空間の拡がりや SBC 線維の伸展を促進する可能性を示唆した。しかし、これが太いバンドル形成につながるかどうかは直接証明することはできなかった。加えて、ピクロシリウスレッド染色を施すことにより、SBC 細線維が凝集することにより太い線維束を形成する様子を可視化することに成功した。SBC/NC 混合線維では、SBC から成る線維を核として NC と思われる SBC とは形態が異なる線維が付着してゆく様子が観察された。この「SBC とは形態が異なる線維」が NC であることの直接証明には届かなかった。また、NaCl の添加により SBC 線維が緻密化しながら強大な線維束を形成していく様子が観察された。これまでの研究代表者を中心とする北大グループの研究（Zhang et al., 2014; 2019）でも SBC のミクロンオーダーのバンドルの形成には NaCl 添加が必要なが報告されており、本研究の観察結果はこれまでの研究結果と一致している。このため、今回観察された「SBC 線維が緻密化しながら強大な線維束を形成」していく過程は、ミクロンオーダーのバンドル形成過程を観察したものと考えられる。

## (1d) リン酸緩衝液 (PB) 濃度が SBC バンドル形成機構におよぼす効果の仮説提唱

SBC 線維形成におよぼす PB 濃度の効果を調べ、それに基づき PB 濃度が SBC バンドル形成機構におよぼす効果の仮説を提唱した。

コラーゲン分子からの線維形成過程は、Lag phase, Growth phase, Plateau phase の3段階に分けられる。これらはそれぞれ、線維形成過程を濁度変化で計測した場合に観察される、最初の濁度が変化しないフェーズ、濁度が急上昇するフェーズ、その後濁度が一定になるフェーズに相当する(図3)。このうち、Lag phase ではコラーゲン分子数個から成る「核」の形成とその縦方向の凝集により「線維ユニット」の形成がおり、Lag phase に続く Growth phase では線維ユニットがおもに横方向に凝集して線維が成長するとされる(図3)。本実験では PB が高いと Lag phase が延長するとともにゆっくりと長時間をかけて Growth phase が進行し、60 mM PB にてミクロンオーダーのバンドル形成が進行し、120 mM PB では太く長い線維が形成された。このことから、PB 濃度により異なる形態の線維ユニットが形成され、それが線維形態を決定するとの仮説を立てた(図4)。今後、1b および 1c で示した技術を用いて PB 濃度の違いによりバンドル形成が進行する過程と細い線維形成が進行する過程とを観察・比較するとともに、NaCl 濃度によりバンドル形成が進行する過程とも比較することで、バンドル形成機構をさらに詳細に検証できるものと考えられる。

また、PB 濃度を変えて形態が異なる線維を細胞培養ウェルにコーティングする技術を開発して L929 線維芽細胞を培養したところ、線維の太さに反応して L929 細胞の形態が変わることを見いだした。以上の成果は学術論文として発行した (Meng et al., 2020)。

## (2) SBC 線維の細胞機能活性化能の実証

### (2a) SBC 線維上で培養した MC3T3-E1 骨芽細胞の遺伝子定量解析

SBC 線維上で培養した MC3T3-E1 骨芽細胞の分化過程を定量 PCR により調べ、直径が小さい細い線維上で培養することで、SBC 分子もしくはブタコラーゲン分子上で培養したものと比べて培養後期に I 型コラーゲンおよびオステオカルシン mRNA の発現が有意に高まることを証明した。両 mRNA は骨芽細胞分化のマーカー遺伝子であり、これらの発現が上昇することは骨芽細胞分化が進展して細胞が活発に骨基質タンパク質を分泌していることを示す。SBC 線維の効果が培養後期に現れたことから、SBC 線維は骨芽細胞の分化の速度を上げるといよりも、分化した骨芽細胞の活性を上昇するものと考えられた。

### (2b) SBC 線維上で培養した MC3T3-E1 骨芽細胞における発現遺伝子のマイクロアレイを用いた網羅的解析

SBC 線維上で培養した MC3T3-E1 骨芽細胞の分化初期(培養1日目)と後期(培養21日目)の遺伝子発現を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、当初予測とは逆にコラーゲン線維に接着した細胞では多くの遺伝子の発現が抑制されることを示した。しかし、フィブロネクチンや VIII 型コラーゲン遺伝子など、いくつかの細胞外基質遺伝子の発現は増加していた。このことから、コラーゲン線維に接着した MC3T3-E1 骨芽細胞では、ある特定の遺伝子の発現が活性化される可能性が示唆される。一方で、コラーゲン線維に接着することが *in vivo* の状態に近いと考えると、コラーゲン分子に接着した MC3T3-E1 骨芽細胞は、生体の骨折部位に観察されるような、外部刺激により骨芽細胞が活性化された状態にあるものと想像された。

### (2c) 共焦点レーザー顕微鏡 (CF-LSM) を用いた焦点接着と F-アクチンの解析

足場の物理的・化学的シグナルを感知することで細胞形態や増殖、分化を変化させる焦点接着

図3 コラーゲン分子からコラーゲン線維が形成される様子の模式図。

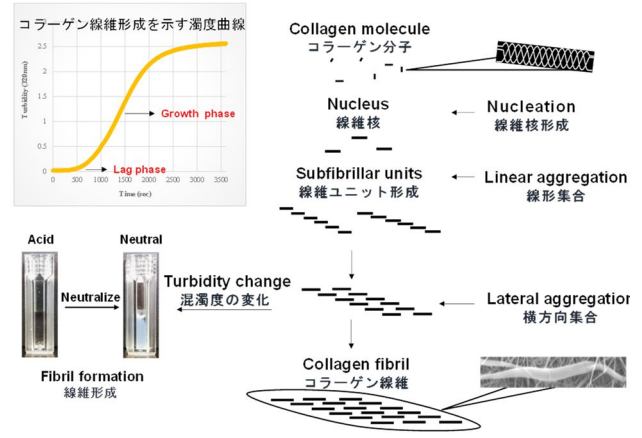
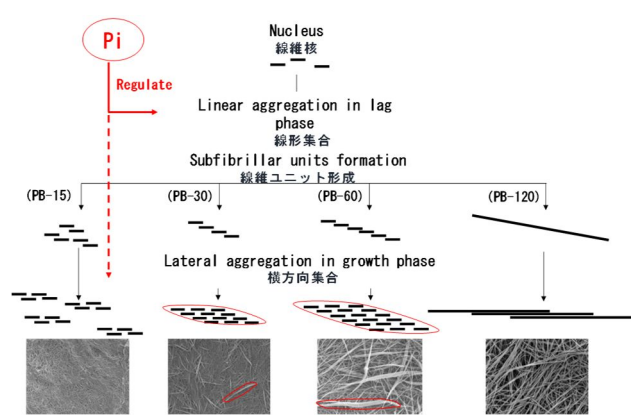


図4 特定の PB 濃度がバンドル形成を促すメカニズムの仮説。



(ピンキュリン)とそれに結合する F-アクチンを蛍光免疫染色し、CF-LSM で観察したところ、コラーゲン線維に接着した MC3T3-E1 骨芽細胞では分子に接着した細胞とはまったく異なる分布を示し、線維と分子ではまったく細胞接着機構が異なることが予想された。このことから、分子と線維に接着した細胞の遺伝子発現を変化させる機構として細胞接着の様式の違いが予想された。

以上のように、本研究により生体内で観察されるミクロンオーダーのバンドル形成機構の解明に資する超遠心分析、AFM 観察、デジタルマイクロスコブ観察技術が開発されるとともに、NaCl 濃度や PB 濃度によりバンドル形成と細い線維の形成を制御できるようになった。今後、これら本研究で開発された技術を用いてバンドル形成過程と細い線維の形成過程とを比較することで、バンドル形成機構をさらに詳細に検証できるものと考えられる。加えて、SBC 線維上の細胞と SBC 分子上の細胞の遺伝子発現比較が線維上の細胞の特徴付けに有効であることが示されるとともに、線維上の細胞の遺伝子発現を変化させる情報の入り口は細胞接着部にあるものと想定される事も示された。今後は細胞とコラーゲン線維との接着装置であるインテグリンとその後の情報伝達経路を線維と分子で比較することで、線維への接着が遺伝子発現を制御する機構の解明が実現する可能性がある。

## 引用文献

1. Meng D, Li W, Ura K, and Takagi Y (2020) Effects of phosphate ion concentration on *in-vitro* fibrillogenesis of sturgeon type I collagen. *Int. J. Biol. Macromol.*, 148: 182-191. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.01.128
2. Zhang X, Adachi S, Ura K, and Takagi Y (2019) Properties of collagen extracted from Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* and assessment of collagen fibrils *in vitro*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 137: 809-820. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.021
3. Zhang X, Ookawa M, Tan Y, Ura K, Adachi S, and Takagi Y (2014) Biochemical characterization and assessment of fibril-forming ability of collagens extracted from Bester sturgeon *Huso huso* × *Acipenser ruthenus*. *Food Chem.*, 160: 305-312. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.075

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Meng Dawei、Li Wen、Ura Kazuhiro、Takagi Yasuaki	4. 巻 148
2. 論文標題 Effects of phosphate ion concentration on in-vitro fibrillogenesis of sturgeon type I collagen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 182 ~ 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.128	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	浦 和寛 (Ura Kazuhiro) (90360940)	北海道大学・水産科学研究院・准教授  (10101)	
研究分担者	柚木 俊二 (Yunoki Shunji) (20399398)	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・主任研究員  (82670)	
研究分担者	畑山 博哉 (Hatayama Hiroya) (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	成田 武文 (Narita Takefumi) (20640056)	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・研究員  (82670)	

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
---------	---------