

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21887

研究課題名（和文）力学負荷によるコラーゲン線維配向誘導を利用した多軸配向線維性組織創出の試み

研究課題名（英文）Development of fabrication technique of fibre-aligned collagenous tissue using mechanical loading

研究代表者

前田 英次郎（Eijiro, Maeda）

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：20581614

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、生体組織は作用する力学負荷に適応した最適な構造を形成する原理に着目し、短時間に任意の線維配向をもつ組織を形成する新たな人工組織形成法の開発に挑んだ。酸性コラーゲン溶液からコラーゲンゲルを作製し、これに一軸方向の力学負荷を作用させつつゲニピンで架橋を施した。力学負荷量および処理時間を調整した結果、作製された人工組織の強度は約5 MPaとなり、未処理の組織と比べて強度を約250倍に高めることに成功した。また、電子顕微鏡観察により組織の線維は力学負荷方向に揃っていること、ラット腱由来の細胞を播種したところ2週間は細胞が生存したことをそれぞれ確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、臨床で求められている生体組織に近い材料、力学特性の人工組織作製に近づく結果である。生体が自然と最適な形態形成を行う過程に着目したことから発生物学的な見地からも興味深い結果と言える。また社会的にも臨床における医療ニーズを満たす可能性を秘めた技術を開発できたと言える。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a new method to fabricate artificial soft tissues with protein fibres aligned to designated directions which is achieved during a relatively short period of time. The method developed is based on how biological tissues form unique fibre structures optimised to support mechanical loading imposed on them. We fabricated collagen gels from acidic solution and applied uniaxial mechanical loading and chemical cross-linkers simultaneously. This resulted in the gel with strength of approximately 5 MPa, which was 250 times as high as that of gels without mechanical loading and the cross-linker. Microscopic observation confirmed the fibre structure aligned to the loading direction. Moreover, tendon cells, isolated from rat Achilles tendons, remained viable following a 2-week culture on the surface of the gels, proving the cytocompatibility of the fabricated tissues.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：コラーゲン 腱 靭帯 血管 人工組織 力学負荷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腱・靭帯、血管、椎間板などの軟組織は損傷すると自己修復しても本来とは異なる癒痕組織が形成されるため自己再生は望めない。自家組織移植による修復の場合、移植片採取回数、移植片採取部の治癒といった問題がある。一方、人工代替材料の埋植による修復の場合、人工腱・靭帯では組織の強度が劣る、使用に伴い摩耗が生じるといった問題が残る。人工血管による修復の場合、比較的直径の大きな血管(動脈)での修復は良好であるものの、直径4mm以下の小口径動脈や幼若年齢患者の動脈への適用は血栓の形成や体の成長との不一致などの問題が依然として存在する。人工椎間板は人工関節と同様に磨耗の問題がある。したがって、生理的生体適合性(異物反応を惹起しない、細胞死が起きない等)と機能的生体適合性(線維配向、弾性、強度の周囲との一致性)を併せ持ち、かつ最終的には自己組織と一体化して組織再生を導く人工組織を効率的に作製する技術の登場が待たれる。

2. 研究の目的

そこで本研究では線維形成中のコラーゲンに力学負荷を作用させて線維配向を誘導する方法を確立するとともに、腱・靭帯、血管、椎間板といった力学負荷支持軟組織にみられるコラーゲン線維配向を持ち、かつ適切な力学特性を有する人工組織を効率的に作製する技術を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

当初計画した方法は以下の通りであった：

I. 人工腱の作製

人工腱として長軸方向に線維が配向し、かつ強度を有するrod状のコラーゲン組織を作製する。中和したI型コラーゲン酸性溶液をダンベル形状鋳型に導入し短時間静置することでダンベル狭隘部に線維形成途中にある未成熟なrod状ゲルを成形する。このゲルに対し、自作装置を用いて腱組織の力学環境を模擬した一軸引張力を作用させて線維形成を更に進め、コラーゲン線維が負荷軸方向に配向した組織を作製する技術を確立する。コラーゲン溶液濃度、化学架橋材の添加量、ならびに負荷パターン(負荷量・時間・静的or動的)を最適化することで、組織の強度が健常腱線維束レベルとなることを目指す。

II. 人工小径血管の作製

血管壁のコラーゲン線維は壁中央部(中膜)では円周方向に、壁外縁部(外膜)では組織長軸に沿って方向にそれぞれ配向しており、これは生体内で血管が血圧によって半径方向に拡張し、かつ長軸方向に伸長していることに因る。ここでは人工小径血管として、これら引張と拡張を同時に支持できる交差螺旋線維配向をもつ1層のコラーゲン組織を作製することを目的とする。市販のコラーゲン溶液から作製した未成熟で線維形成途中のコラーゲンゲルを血管を模したチューブ状に形成する。その中空を水圧で加圧することでゲルを半径方向に拡張させつつ、ゲル長軸方向にも伸長する2方向負荷で血管力学環境を模擬し、コラーゲン線維形成を更に進めて人工血管を作製する。また、交差螺旋の線維配向角と組織弾性率の関係をデータベース化し、血管の部位に応じた弾性をもつ人工血管の作製を可能とする。

4. 研究成果

I. 人工腱の作製

まず力学負荷による線維配向と力学特性の向上効果を確認するため、作製したコラーゲンゲルに対して2gの負荷を与えて緩衝液中で24時間または48時間インキュベートしたところ、引張試験で求まる破断応力は177kPaから24時間インキュベーションで679kPa、48時間インキュベーションで988kPaへと増加した。力学負荷を4gへと増加させたところ、破断応力は24時間で1077kPaへとさらに増加した一方で、48時間では644kPaであった。4gを付加する際、通常のPBSではインキュベーション中にゲルが破断したため、PBSにポリエチレングリコール(PEG)を添加する工夫を行い、破断を防いだ。PEGはコラーゲン分子間の架橋形成や強度向上そのものには直接的には寄与せず、引張によって浸出するゲル中の水分を効果的に吸収すること、およびコラーゲンゲル中での線維形成を促進することで、効果的に力学負荷によるゲル強化を

アシストしたと考えられる。

走査型電子顕微鏡で観察したところ、2 g および 4 g のどちらの負荷下で形成したゲルにおいてもコラーゲン線維が負荷方向に配向したことがわかり、2 g よりも 4 g の方がより配向性が高いことがわかった。

次いで更なる強度向上を目的として、力学負荷インキュベーションと同時に化学架橋を行うこととし、ゲニピンを濃度 10 mM で PBS に添加した。その結果、2 g 負荷の場合 48 時間インキュベーションの場合破断応力は約 3 MPa まで向上した。同様に 4 g 負荷の場合は 48 時間インキュベーションで約 4 MPa まで向上した。

作製したゲルの細胞親和性を検証するため、ラットアキレス腱から単離した腱細胞を 4 g 負荷と化学架橋で形成したゲル表面に播種して 2 週間培養したところ、細胞生存率は 92% であり、細胞毒性のないことが示された。

また、ゲルを貫通した縫合糸による張力に対する耐力を調べた実験 (Suture retention test) では、その耐力は 0.05 N であった。

本法で到達した強度は例えばヒトアキレス腱の線維束の破断強度が 10 MPa であることと比べた場合、その 50% 程度である。今後はゲル作製に使用するコラーゲン溶液濃度を上げる、力学負荷の量や時間を最適化することで、更なる強度向上が見込まれると考えている。

II. 人工小径血管の作製

人工血管作製を目指した工程では、当初より作製した円筒型ゲルの強度が弱く、力学負荷に耐えさせるために様々な工夫をこらした。その結果、内圧 5 mmHg、長軸方向負荷 1 g でインキュベーションを行なった。内圧-外径試験で求めた破裂内圧はインキュベーション前の 18 mmHg から 33 mmHg へと向上し、その時のゲル壁円周方向応力は約 10 kPa から約 60 kPa へと向上した。しかしながら、線維配向解析を行なったところ、当初想定した 2 軸負荷による交差螺旋配向は確認されなかった。したがって、今回見られた強度の向上は線維配向によるものではなく、力学負荷によってコラーゲン分子間架橋（水素結合）が促進されたためであると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Maeda Eijiro, Kuroyanagi Kaname, Matsumoto Takeo	4. 巻 123
2. 論文標題 Microscopic characterisation of local strain field in healing tissue in the central third defect of mouse patellar tendon at early-phase of healing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 104702 ~ 104702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmbbm.2021.104702	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 -

1. 著者名 Maeda Eijiro, Kawamura Ryota, Suzuki Takashi, Matsumoto Takeo	4. 巻 -
2. 論文標題 Rapid fabrication of tendon-like collagen tissue via simultaneous fibre alignment and intermolecular cross-linking under mechanical loading	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1748-605X/ac7305	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河村僚太, 松本健郎, 前田英次郎
2. 発表標題 化学架橋がコラーゲン線維構造の力学特性に与える影響
3. 学会等名 2020 年度日本生体医工学会東海支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河村僚太, 松本健郎, 前田英次郎
2. 発表標題 力学負荷による線維配向誘導とゲニピン架橋を用いた腱様コラーゲン組織形成に関する研究
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田英次郎
2. 発表標題 生体組織構造と機能に学ぶ人工材料作製技術
3. 学会等名 日本材料学会第70期学術講演会 複合材料/生体・医療材料部門委員会講演会「生体・医療材料と複合材料の未来」（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 キム ジョンヒョン、前田英次郎、松本健郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善プラネット	5. 総ページ数 6
3. 書名 最先端ナノライフシステム研究 第1編 5章「力で組織・細胞を制御する」	

〔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	松本 健郎 (Matsumoto Takeo) (30209639)	名古屋大学・工学研究科・教授 (13901)	

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