

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592520

研究課題名（和文）機能性リコンビナントミニコラーゲンと骨形成蛋白による骨再生の基礎的研究

研究課題名（英文）Testing the utility of rationally engineered recombinant collagen-like proteins for applications of bone regeneration with bone morphogenetic protein in tissue engineering.

研究代表者

服部 宇 (HATTORI HISASHI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60332699

研究成果の概要（和文）：骨形成蛋白(bone morphogenetic protein)に特化した設計のリコンビナントミニコラーゲンを cDNA カセットシステムにより作製，骨再生スキャフォールドとして異所性骨形成，実験的骨欠損部での骨再生能力を評価した．cDNA カセットは，D4 周期が 2 連続したものが，良好な骨形成を示した．既存のスキャフォールドと遜色のない骨再生力を示した．

研究成果の概要（英文）：We mapped the D4 domain of human collagen I as most critical for binding site of bone morphogenetic protein(BMP) and used this information to genetically engineer a collagen-like protein consisting of tandem repeats of the D4 domain(mD4 collagen). We proved recombinant human mD4 collagen-like protein had a potential for an efficient scaffold as same as other scaffolds materials for engineering of bone when combined with BMP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：リコンビナント・cDNA カセット・コラーゲン・骨形成蛋白(BMP)・骨再生・スキャフォールド・DDS（ドラッグデリバリーシステム）

1. 研究開始当初の背景

われわれはリコンビナント procollagen 発現システムおよび cDNA カセットシステムを開発し，その応用として骨形成蛋白(BMP)に特化した親和性を有するリコンビナントミニコラーゲンを開発した．各種サイトカインとの親和性を検討したところ，D4 部分に骨形

成蛋白(BMP)との親和性の高い binding site があり，D4 部分を二重以上にすることで，骨形成活性を増大させることが示唆された．作製する新規機能性 ヒトリコンビナントミニ type I collagen scaffold はいわば BMP のオーダーメイド Scaffold であり，既存の商品化された Scaffold との骨再生における能

力の評価が必要である。cDNA カセットシステムでは、ヒト type I procollagen のアミノ酸配列を変化させることなく設計可能であり、結合組織性疾患に認められるような変異を生じさせることなく蛋白の発現、回収が実現できる。発現系においてはヒト遺伝子、ヒト由来細胞を用いるため、マテリアルの医用材料への応用に際する動物由来のウイルス、蛋白疾患の発生に対する危険はない。

2. 研究の目的

Collagen は抗原性が低く、免疫反応の低い蛋白として知られているが、本邦での研究は collagen の部分的生化学、形態学研究または動物 collagen の抽出、抗原性の除去などが多く、collagen 前駆物質の procollagen に関する研究は皆無である。本研究において利用されるリコンビナント procollagen 発現システムおよび cDNA カセットシステムは Dr. Darwin J. Prockop (Center for Gene Therapy, Tulane University, U. S. A) の研究室において Dr. Fertala ら、Dr. Arnold らによって報告され、これまで本邦での報告、応用は申請者らのみである。申請者は 1995-1998 年に上記研究者の研究室に留学し、現在も Dr. Fertala と共同研究を施行している。われわれは、現在までリコンビナントコラーゲンの継続的な研究において、各種サイトカインとの親和性を検討中に、偶然にも D4 部分に Bone morphogenetic protein (BMP) の親和性の高い binding site があり、D4 部分を二重以上にすることで、骨形成活性を増大させることを発見した。つまりこれまで報告されている DDS としての scaffold や担体よりも、よりサイトカインの活性を増大させる可能性のある DDS システムを発見した。新規 collagen 分子が特定の BMP 分子と強い結合力を持ち、骨形成活性を増大させることが可能となれば、骨再生分野における応用は計り知れない。本研究において使用する骨関連サイトカイン BMP は、ヒト遺伝子由来リコンビナント蛋白として製品化されており、米国 FDA に認可され、整形外科、顎顔面口腔外科領域において臨床応用されており、その安全性についても検証されている。また、BMP の製造特許が数年内に失効するため、今後は各種マテリアルとの組み合わせによる複合特許が加速化されるものと考えられる。本研究で作製する新規機能性 ヒトリコンビナントミニ type I collagen scaffold はいわば BMP のオーダーメイド scaffold であり、既存の商品化された scaffold との骨再生における能力の評価は大変興味深い。われわれの cDNA カセットシステ

ムでは、ヒト type I procollagen のアミノ酸配列を変化させることなく設計可能であり、結合組織性疾患に認められるような変異を生じさせることなく蛋白の発現、回収が実現できる。発現系においてはヒト遺伝子、ヒト由来細胞を用いるため、マテリアルの医用材料への応用に際する動物由来のウイルス、蛋白疾患の発生に対する危険はない。われわれは BMP に特化した新規機能性 ヒトリコンビナントミニ type I collagen scaffold の開発を目的とした。

3. 研究の方法

ヒトタイプ I プロコラーゲン遺伝子の cDNA からサブクローニングした cDNA カセットのにより、三本鎖の一連の D-periods を限定する 4.4 ブロックの 234 アミノ酸と 78 アミノ酸の二つ (D2, D3) を欠損させたリコンビナント type I procollagen homotrimer cDNA (ミニリコンビナント type I procollagen cDNA) を作製。作製した D2, D3 欠損 type I procollagen cDNA を用いて、ヒト由来哺乳動物細胞 (HT1080 fibrosarcoma cell, SW-1353 chondrosarcoma cell) に遺伝子導入、強制発現、リコンビナント蛋白を分泌させる。

ヒトタイプ I プロコラーゲン遺伝子の cDNA からサブクローニングした cDNA カセット、N-telpro, D1, D4, D4.4, C-telpro から

① N-telpro-D1-D4-D4.4-C-telpro

② N-telpro-D1-D4-D4-D4.4-C-telpro

③ N-telpro-D1-D4-D4-D4.4-C-telpro

telpro:telopeptide

①, ②, ③の cDNA カセットを作製し、蛋白の発現量、回収率を比較検討し、発現回収効率の良好なカセットを選択、大量培養、リコンビナント蛋白を抽出、精製。

リコンビナント蛋白は綿状、シート状に賦形成、BMP の至適濃度、徐放性試験を施行。

ヌードマウスの大腿筋膜下に BMP + scaffold 複合体を移植、軟 X 線、組織切片にて評価。

次に、各種リコンビナント BMP から活性の高いものを選択 (BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF-5, GDF-11 etc) するため、白色家兎頭頂骨骨形成モデルを用いて検討。

白色家兎を静脈麻酔後、頭頂骨を明示、頭頂骨に深さ約 1 mm のタップおよびラウンドホールを形成、特別注文した直径 6 mm のチタン円柱をタップに合わせてねじ込み固定、円柱内部に BMP + scaffold 複合体を移植する。特製のチタンプレートできっちり蓋をして、8 週後に

屠殺する。このモデルの利点は、骨形成の栄養供給路がチタン円柱下の頭頂骨のみであり、骨誘導能力のない充填物の場合、骨形成は得られない。下部頭頂骨とともに円柱を取り出し、研磨標本として骨形態計測を行う。Scaffoldのコントロールとして β -TCP (Osferion; オリンパステルモバイオマテリアル社製), PuraMatrix™ (3Dマトリックス社製の合成ポリペプチド), アテロコラーゲン製剤 (テルプラグ; オリンパステルモバイオマテリアル社製) を使用, ポジティブコントロールとして白色家兎腸骨から採取した海綿骨を使用。

4. 研究成果

ヒトタイプIプロコラーゲン遺伝子のcDNAからサブクローニングしたcDNAカセット, N-telpro, D1, D4, D4.4, C-telproから
①N-telpro-D1-D4-D4.4-C-telpro
②N-telpro-D1-D4-D4-D4.4-C-telpro
③N-telpro-D1-D4-D4-D4-D4.4-C-telpro

telpro:teloptidepropeptide

3つのリコンビナントミニコラーゲンcDNAカセットを作製, DNAシーケンスを行い, 遺伝子配列を確認。作製された①, ②, ③のcDNAをヒト由来哺乳動物細胞 (HT1080

fibrosarcoma cell, SW-1353 chondrosarcoma cell) にリン酸カルシウム法を用いて遺伝子導入, 強制発現させ, 強陽性細胞をスクリーニングした。強陽性細胞のみ大量培養を行い, リコンビナントミニプロコラーゲン蛋白を抽出した。アミノ酸シーケンスを行い, アミノ酸配列を確認。①, ②, ③のリコンビナントミニプロコラーゲン蛋白にN-protenase, C-protenaseを作用させ, N末端, C末端のpropeptideを切断, 三重らせん構造を確認し, リコンビナントミニコラーゲン蛋白を回収。リコンビナントミニコラーゲン蛋白は凍結乾燥処理後に加熱処理, 架橋処理を行い, 綿状, シート状のscaffoldを試作。骨形成蛋白 (BMP-2:PROSPEC社製) 500ng, 1 μ g, 5 μ g, 10 μ gを①, ②の綿状, シート状のscaffoldと組み合わせ, ノードマウスの大腿筋膜下に移植, 軟X線写真, HE染色を施した組織切片にて評価したところ, 異所性骨化はすべての組み合わせで認められ, 骨形成蛋白の1 μ g, 5 μ g, 10 μ gでは, ほとんど有意な差は認められず, 少量でも良好な骨形成が確認された。

①②③の比較では, ③よりも①②が有意に骨形成が良好であり, ③では①②ではほとんど認められなかった炎症反応も存在した。①②の比較では, ②のほうが, 骨形成の時期が早期で, 骨形成量が多く, 炎症反応も少ない傾

向が認められた。綿状とシート状では綿状のほうが, DDSとして吸収崩壊が早く, 炎症反応も少なく, 骨形成量が多いことが示唆された。シート状では, DDSとして吸収崩壊速度が遅く, 骨形成後の炎症反応が比較的長く認められ, 骨量の維持には不利に働く傾向が認められた。

リコンビナントミニコラーゲン蛋白は, GDF-5 (PROSPEC社製), GDF-11 (R&D systems社製) との親和性は悪く, 骨形成量も少ない傾向が認められた。リコンビナントミニコラーゲン蛋白は, BMP-2, BMP-4, BMP-7 (PROSPEC社製) と特異的に親和し, 100ngと少量の骨形成蛋白でも有意な骨形成を生じる可能性が示唆された。BMP-2, BMP-4, BMP-7 (PROSPEC社製) では骨形成の有意な差は認められなかった。

白色家兎頭頂骨骨形成モデルを用いた骨形成についての検討では, 骨形成蛋白とスキヤフォールドとしてリコンビナントミニコラーゲン, β -TCP (Osferion; オリンパステルモバイオマテリアル社製), 合成ポリペプチド (PuraMatrix; 3Dマトリックス社製), アテロコラーゲン製剤 (テルプラグ; オリンパステルモバイオマテリアル社製) 群のすべてはポジティブコントロールの白色家兎腸骨海綿骨群よりも有意に骨形成量が多いことが示唆された。またスキヤフォールドとして, リコンビナントミニコラーゲンは β -TCP (Osferion; オリンパステルモバイオマテリアル社製), 合成ポリペプチド (PuraMatrix; 3Dマトリックス社製), アテロコラーゲン製剤 (テルプラグ; オリンパステルモバイオマテリアル社製) と同等の骨形成量であり, 有意な差を認めなかった。しかし炎症反応は, 合成ポリペプチド (PuraMatrix; 3Dマトリックス社製) が最も強く, 次にアテロコラーゲン製剤 (テルプラグ; オリンパステルモバイオマテリアル社製) の炎症反応が強い傾向が認められた。 β -TCP (Osferion; オリンパステルモバイオマテリアル社製), 合成ポリペプチド (PuraMatrix; 3Dマトリックス社製), アテロコラーゲン製剤 (テルプラグ; オリンパステルモバイオマテリアル社製) はDDSとして吸収崩壊速度が遅く, 骨形成組織中での残存量が多く, 組織炎症反応がより持続していた。リコンビナントミニコラーゲンは炎症反応がより少ないことが示唆された。

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 2 件)

①Ikeno M, Hibi H, Kinoshita K, Hattori H,

Ueda M.

Effects of self-assembling peptide hydrogel scaffold on bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein-2. Oral & Craniofac Tis Eng, 査読有, Vol.1(2),2011, pp.91-97.

②Ikeno M, Hibi H, Kinoshita K, Hattori H, Ueda M.

Effects of the permeability of shields with autologous bone grafts on bone augmentation. Oral & Craniofac Tis Eng, 査読有, Vol.1(3),2011, pp.198-204.

[学会発表] (計 4 件)

①服部 宇

Testing the utility of rationally engineered recombinant collagen-like proteins for applications of bone regeneration in tissue engineering. International Society for Cellular therapy Europe Meeting, 2010.9.11, Belgirate, Italy

②服部 宇

Testing the utility of rationally engineered recombinant collagen-like proteins for applications of bone regeneration in tissue engineering. World conference on regenerative medicine 2009.11.1, Leipzig, Germany

③服部 宇

機能性リコンビナントコラーゲンの基礎的研究 第2報スキャフォールドとしての検討. 第54回日本口腔外科学会総会, 2009.10.10, 札幌

④服部 宇

Ectopic bone formation induced by implantation of stem cells by sonichedgehog gene-transduction with recombinant collagen-like protein scaffolds. Termis 2nd World Congress, 2009.9.2, Seoul, Korea.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 宇 (HATTORI HISASHI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60332699

(2) 研究分担者

伊藤憲治 (ITO KENJI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50402623

(H21)

木下一彦 (KINOSHITA KAZUHIKO)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40467296

(H21-H22)

上田 実 (UEDA MINORU)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00151803

(3) 連携研究者

なし.