

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24241044

研究課題名(和文) 材料工学と細胞生物学の融合による魚鱗コラーゲンマテリアルテクノロジーの構築

研究課題名(英文) Creation of fish scale collagen material technology integrated with material engineering and cell biology

研究代表者

生駒 俊之(Ikoma, Toshiyuki)

東京工業大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20370306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,800,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン線維からなる魚鱗の階層構造を人工的に構築することを目的として、魚の鱗から抽出したコラーゲンを温度・pH・塩濃度を制御した流れ場の中で線維化させることで、一方向に配向したコラーゲン線維膜を形成させた。同時に、細胞がコラーゲンを分泌させる経路を世界で初めてその場計測する技術確立した。また、魚鱗由来の細胞を培養することで、鱗の階層構造を構築するためには基板の形態が重要であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to construct the hierarchical structure of fish scale including collagen fibrils. The collagen extracted from fish scale was fibrogenesis under the flow field controlled temperature, pH and salt concentrations, and the alignment of collagen fibrils were formed. Furthermore, in situ technology about the observation of collagen production process inside cells were established. To construct the hierarchical structure similar to scale by fish cells, the substrate morphology was of great importance.

研究分野：生体材料

キーワード：ナノ機能材料

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは、タンパク質の約30%をも占めるため、再生医療を実現するバイオマテリアル(足場材料)として最も重要な素材である。組織中では、線維(0.3~3 μ m)を形成し、引張・圧縮・ねじれといった力学的負荷に耐える構造をつくる。また、コラーゲンは、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD配列)といった細胞接着(膜タンパク質:インテグリン)部位をもつと共に、機能性タンパク質(フィブロネクチン・ラミニン・ビトロネクチンなど)やプロテオグリカンと呼ばれる多糖類(グリコサミノグリカン)と結合して細胞との接着・移動・分化・増殖・成熟、さらにシグナル伝達を促進する。つまり、細胞はコラーゲンを含む細胞外マトリックスに接着することで機能を発現することから、コラーゲンを基板とした優れたバイオマテリアルの創出が期待できる。

コラーゲンは、グリシン(Gly)-Xaa-Yaa(Xにはプロリンが、Yにはヒドロキシプロリンが配置される)の繰り返しといった固有の配列を有し、約1000個のアミノ酸からなるヘリックス構造をつくる。3本の鎖からなる三重らせん構造をもつ棒状のコラーゲン分子(300 \times 1.5nm)は、1/4ずつずれてコラーゲン原線維(10-300nm、周期構造67nm)をつくり、この原線維がさらに水素結合することでコラーゲン線維を構成する。コラーゲンの安定性および線維形成能や細胞に対する機能性は、主にリシン側鎖が分子修飾されることに強く関係するがその機能は十分に解明されていない。

細胞におけるコラーゲン生合成経路では、まず、リボソーム内のタンパク質翻訳によりプロコラーゲンがつけられ、プロペプチド(三重らせん構造にさせないため存在)と呼ばれるヘリックス構造をもたない長い一本の鎖がつくられる。これが小胞体およびゴルジ体に移動してプロリンやリシンがヒドロキシル化や糖鎖付加など分子修飾を受け、プロペプチド部分のジスルフィド結合で3本の鎖が自己会合し三重らせん構造が形成される。その後、細胞外へ分泌されてテロペプチド部位が酵素で切断され、細胞外で原線維および線維が構築される。近年の美容・健康分野や医薬・医療分野など多方面からのコラーゲンへの注目を背景として、これらの生合成経路を利用し、扱いが容易な酵母や植物からヒト型のリコンビナントコラーゲンを産生する技術も開発されている。しかし、これらが産生するコラーゲンは高次構造を持たず、角膜実質や鱗に観測される、コラーゲン線維の直行した配向層状構造がどのように形成されるかは現在も不明である。配向層状構造の形成機構を生物学的に理解し、コラーゲン線維層が交互に直行する構造変換物質を探索し、材料工学的に再現することが本研究の目的である。

産業上用いられているコラーゲンはI型で

あり、ウシ・ブタの皮や骨から抽出されている。皮膚に存在するコラーゲン線維は、その構造が無秩序で線維間に架橋が少ないため抽出しやすい。しかし、ウシ・ブタ由来コラーゲンは人獣共通感染症の可能性のあるため、代替物の探索が進められている。魚由来コラーゲンはヒトと共通のウイルスが存在せず、有力な候補である。これまでに、我々は、テラピアの鱗のコラーゲン線維構造がヒトの角膜実質と類似していることを見出し、また、企業との共同により、既に鱗から高純度でコラーゲンを抽出・精製する大量生産プラントの構築と実用化(化粧品・培養容器)に成功している。このプラントでは、コラーゲンの両末端にある抗原性部位を酵素(ブタ由来のペプシン)で切断したアテロ化コラーゲンを量産している。鱗コラーゲンの有効性をさらに引き出し、より優れた医療デバイスを開発するためには、

- (1) 配向層状構造の形成機構解明(マイクロ流路及び鱗の基質形成細胞の関与の検討)、
- (2) 鱗の成分分析による配向層間にある構造変換物質の探索、
- (3) 鱗抽出コラーゲンの分子修飾及び配向層状構造の生体外構築、

が必要とされる。これら異分野の融合研究により、生体組織の治癒や成長過程と同期する、すなわち生体代謝により組織構築を促す、『組織応答型バイオマテリアル』を開発する。

2. 研究の目的

魚鱗はヒトの角膜実質や皮質骨と同じコラーゲン3次元構造を持つが、ヒト組織とは異なり何度も再生する。その構造再生の機構解明を基盤として、材料工学的にコラーゲン組織の配向層状構造を構築する技術確立を行い、生体組織(軟骨・靭帯・角膜実質・髄核など)の治癒や成長過程と同期する『組織応答型バイオマテリアル』の開発を目指す。このような学際的基礎研究を行うために材料工学と細胞生物学を融合し、生体修復材料として機能的に優れたテラピアの鱗を研究対象として、コラーゲン線維配向技術の確立と材料工学的な物理化学特性の解明、鱗の基質形成細胞を用いたコラーゲン線維の配向層状構造の成因探求により「コラーゲンマテリアルテクノロジー」を確立する。

3. 研究の方法

コラーゲンは、濃度・pH・温度・塩濃度の諸条件を最適化することで線維化して、ゲルを形成する。これまでにテラピア鱗コラーゲンは、リン酸緩衝溶液中でもコラーゲン濃度が60 μ g/mL以下の場合、線維化が起きないことを明らかにしている。流れ場(マイクロ流路)を用いてコラーゲン線維配向を実現するためには、基板とコラーゲンの相互作用を明らかにし、基板表面でのコラーゲン吸着によりコラーゲン濃度の向上をさせ、さらに基板表面(溶液側)

の温度を線維形成に最適な温度（25 ～ 28 ）に制御することが必要である。温度はペルチエ素子により精密に制御した。基板材料として、シリコンウエハー・ガラスなどを用いてコラーゲンの吸着・線維形成を行った。また、流れの速度を制御して、コラーゲン線維の配向度を走査型電子顕微鏡（SEM）・原子間力顕微鏡（AFM）観察によるフーリエ変換手法により計算した。

鱗基質形成細胞の培養に関しては、金魚による報告例がわずかにあることから、金魚を用いた。鱗基質形成細胞は鱗の体側表面に密着して存在することから、採取した鱗の表皮が附着していない部分を切り出し、血清添加した L-15 培地にて鱗の断片ごと培養した。なお、金魚におけるこれら遺伝子の配列は既知であるが、テラピアに関する情報はないため、登録されている各種動物由来の当該遺伝子 cDNA の配列から degenerated primer (縮合プライマー) を設計し RT-PCR 法を用いた。また、培養している鱗基質形成細胞やヒトの線維芽細胞の運動の様子をタイムラプスカメラにより撮影しコラーゲン高次構造の構築過程を調べた。鱗基質形成細胞や線維芽細胞の細胞周期を同時期で一旦停止させ、処理の解除により同調的に開始させた細胞周期の下で形成されるコラーゲン構造を経時的に SEM や AFM で調べた。

4. 研究成果

塩酸性溶液 (pH4) に鱗コラーゲンを加えて 0.111wt% に調整し、リン酸緩衝溶液を 4 に加えた。pH と塩濃度を調整したコラーゲン溶液を、ヘモカバーガラスを固定した角型溶液に適量加え、ペルチエ素子に乗せて、冷蔵庫内に設置したシーソーシェーカー (10.5s/cycle) で往復させ、流れ場を作製した。ペルチエ素子の温度を 35 に調整し、角型容器表面の温度を 28 に保持させた。時間経過によるコラーゲン線維形態を原子間力顕微鏡で観察した (図 1)。

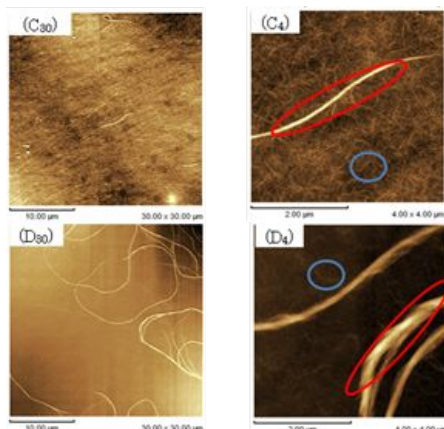


図 1 時間経過によるコラーゲン線維成長：流れ場の方位は左右(c:30分後、d:60分後)

温度を制御した後、ナノメートルサイズ

(3nm 直径)の微細な線維状の物質(青丸棒)が材料表面に全面に形成(10分後)し、その後、周期構造のあるコラーゲン線維(30nm 直径:赤丸棒)が形成した。ナノメートルサイズの微細な線維の基板表面を被覆する面積は、30分後に最大(12.6%)となり、1時間後では減少(5.0%)した。これらの結果から、最初にコラーゲン分子が基板表面に吸着し、さらにコラーゲン分子が分子間力によりナノメートルサイズの線維をつくり、その後この線維が表面拡散により合して周期構造をもつ線維が形成するものと考えられる。

基板の濡れ性の違いによるコラーゲン線維形成と配向強度の数値化は、シーソーシェーカーの周期(3.7、7.0、10.5、14.0s/cycle)と基板温度(30、35、40)を変えて評価した。ガラス基板はシリコンウエハー(接触角25度)と比較して濡れ性が高く、超親水性である。また、配向強度の数値化には、SEM像による高速フーリエ変換を用いた Fiber Orientation Analysis Ver.8.13 で行った。その結果を図 2 に示す。

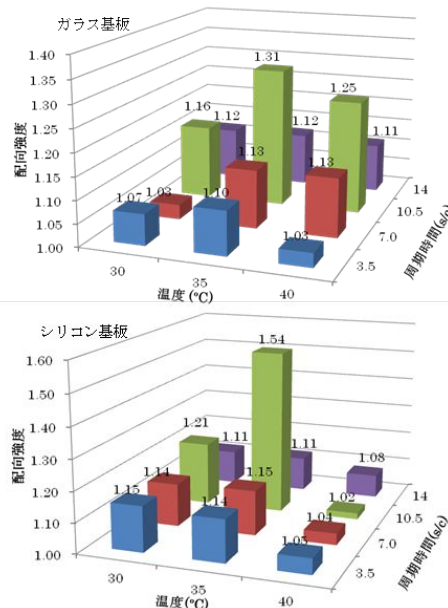


図 2 周期時間と温度がコラーゲン線維配向性を与える影響(上:ガラス基板、下:シリコン基板)

これらの結果から、コラーゲン線維が最も高い配向強度を示すのは、ペルチエ素子温度 35 で、周期時間が 10.5s/cycle であった。ペルチエ素子の温度を 40 にすると、基板表面に吸着したコラーゲンがゼラチンに変性してしまうため、線維に方向性が得られず、ランダムな配向性を示すと考えられる。一方で、基盤温度を 30 にすると、ナノメートルサイズの微細な繊維状物質の量が少なくなり、線維形成に方向性を与えられなかったと考えられる。これらの結果から、基板表面に吸着したコラーゲン分子の状態が線維形成に大きく影響を与えていることが分かった。

一方向の流れ場をつくるため、アクリル製の容器により高さ 750μm、幅 20mm の流路を作

製した。このアクリル製の容器の底面にペルチ素子を置き、銅板を介してヘモカバガラスを流路内に設置した。これにより、ガラス表面の温度を制御した。周囲の環境は4で一定に保ち、容器の角度を変えて層流の流れ場をつくった。用いた流路のレイノルズ数(Re)を算出した。これより、角度を15度と20度にしたときのReの値は、それぞれ 3.06×10^{-3} と 4.59×10^{-3} であったため、本装置でできる流れ場が層流であることを確かめた。これまでと同じコラーゲン溶液を用いて線維形成をSEM像により確認した。その結果を図3に示す。

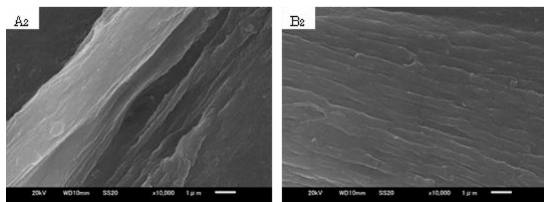


図3 形成したコラーゲン線維; A 流速 40cm/s、B 流速 60cm/s

流れ場の方向(左右)に対してほぼ平行にコラーゲン線維が形成していた。また、流速によらず、配向強度は1.4程度であった。

ベニヤ板様三次元層板構造を有するコラーゲン材料を開発するための生物学的なアプローチ法として、コラーゲンの分泌過程をその場観察可能な実験系を確立した。コラーゲン cDNA の中央部に緑色蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を組み込んだプラスミドを作成し(図4)コラーゲンを分泌する培養体細胞(NIH3T3線維芽細胞)に発現させることにより、EGFP-コラーゲン融合タンパク質がコラーゲン線維に取り込まれることを確認した。

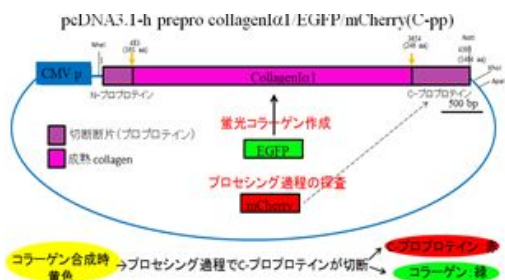


図4 蛍光コラーゲン発現ベクターの模式図

このEGFP-コラーゲン融合タンパク質の分泌過程を蛍光ライブイメージング法により録画し、コラーゲン線維の分泌過程を世界で初めて可視化することに成功した。さらに、コラーゲン中央部のEGFPに加えて、色の異なる蛍光タンパク質(mCherry)をコラーゲンのプロセッシング部位(N, C末端の切断部位)内に組み込んだベクターを作成することにより(図4:C末端-mCherryの例)これまで未解明であったコラーゲンのプロセッシングの過程についても色変化によって解析することを成功にした(図5)。さらに、この色変化の詳細な解析により、コラーゲンタンパク

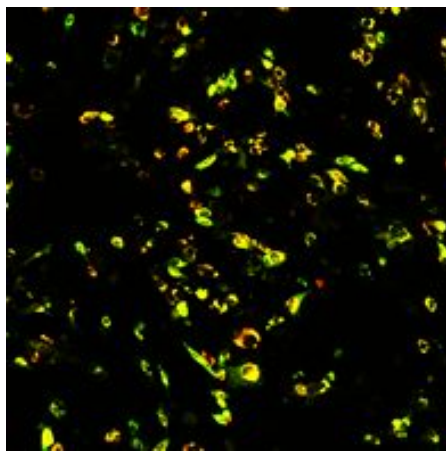


図5 蛍光コラーゲン発現細胞の共焦点写真像

質のプロセッシング過程が、細胞のZ軸に沿った位置によって分担化されていることを見出した(図6)。細胞内に生合成された蛍光コラーゲンは、細胞外に分泌された後も蛍光を発することを確認した。

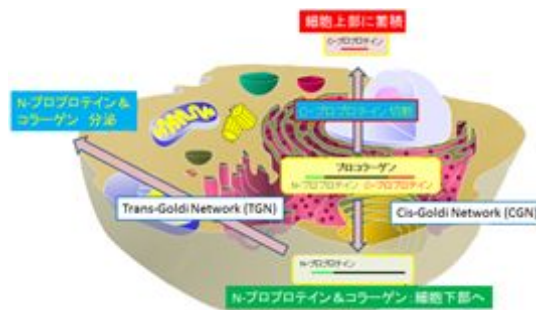


図6 本研究で明らかにしたコラーゲン生合成過程のモデル

三次元層板構造を有する次世代型コラーゲンをシャーレ上に構築する条件の検討に取り組み、三次元層板構造の基本となる、コラーゲン線維を同一方向に整列させる条件の1つとして、うろこ表面の構造(隆起線、溝条)が係わる可能性を見いだした。培養細胞からシャーレ上に分泌されたコラーゲンの物性を調べるために原子間力顕微鏡(AFM: 図7)による検討を行い、60nmの周期構造をもつコラーゲン線維構造がシャーレ上に形成されていることを明らかとした。

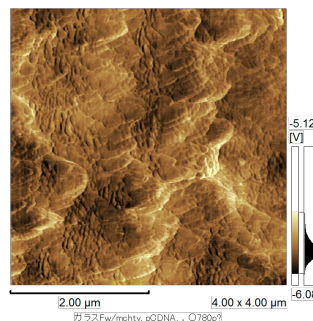


図7 AFMによる位相像

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 8 件)

- (1) Chen MH, Yoshioka T, Ikoma T, Hanagata N, Lin FH, Tanaka J, “Photoluminescence and doping mechanism of theranostic Eu³⁺/Fe³⁺ dual-doped hydroxyapatite nanoparticles, Science and Technology of Advanced Materials, 15, 2014, 55005 (査読有)
- (2) Motozuka S, Tagaya M, Shiba K, Xu ZF, Nishikawa M, Yoshioka T, Ikoma T, Tanaka J, “Effective composite preparation between graphite and iron particles by the interfacial mediation of force-activated oxygen atom”, Industrial & Engineering Chemistry Research, 53, 2014, 16737-16753 (査読有)
- (3) Lee KT, Liu DM, Liang YY, Matsushita N, Ikoma T, Lu SY, “Porous fluorine-doped tin oxide as a promising substrate for electrochemical biosensors-demonstration in hydrogen peroxide sensing”, Journal of Materials Chemistry B, 44, 2014, 7779-7784 (査読有)
- (4) Tagaya M, Ikoma T, Xu ZF, Tanaka J, “Synthesis of luminescent nanoporous silica spheres functionalized with folic acid for targeting to cancer cells”, Inorganic Chemistry, 53, 2014, 6817-6827 (査読有)
- (5) Ban X, Bian Y, Takizawa Y, Hashimoto T, Kitamura N, Ikoma T, Tanaka J, Inagaki Y, Komada M, Tanaka T, “ERK-dependent downregulation of Skp2 reduces Myc activity with HGF, leading to inhibition of cell proliferation through a decrease in Id1 expression”, Molecular Cancer Research, 11, 2013, 1437-1447 (査読有)
- (6) Tanno T, Shigematsu T, Nishikawa S, Hayakawa A, Denda K, Tanaka T, Komada M, “Ubiquitin-interacting motifs confer full catalytic activity, but not ubiquitin chain substrate specificity, to deubiquitinating enzyme USP37”, Journal of Biological Chemistry, 289, 2013, 2415-2423 (査読有)
- (7) Hara M, Abe Y, Tanaka T, Yamamoto T, Okumura E, Kishimoto T, “Great wall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase promoting factor”, Nature Communications, 3, 2012, 1059-1059 (査読有)
- (8) Fujino T, Takeuchi A, Maruko-Ohtake A, Ohtake Y, Satoh J, Kobayashi T, Tanaka T, Ito H, Sakamaki R, Kashimura R, Ando K, Nishimaki-Mogami T, Ohkubo Y, Kitamura N, Sato R, Kikugawa K, Hayakawa M, “Critical role of farnesoid X receptor (FXR) for hepatocellular carcinoma cell proliferation”, Journal of Biochemistry, 152, 2012, 577-586 (査読有)

〔学会発表〕(計 21 件)

- (1) 峯元誠也、杉山友明、生駒俊之、田中順三、“水酸アパタイト/コラーゲン複合体と

ポリエチレングリコールとの線照射による架橋”,日本セラミックス協会 2015 年年会、2015 年 3 月、岡山大学・岡山

- (2) Hirosawa S, Yoshioka T, Ikoma T, Tanaka J, “Alignment of Tilapia fish scale collagen fibers with flowing fluid on glass substrate and silicon wafer”, The 8th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, 2014 June, Mielparque-Yokohama, Yokohama
- (3) Watanabe R, Yoshioka T, Ikoma T, Tanaka J, “Formation mechanism of polyphosphate/collagen/hydroxyapatite”, The 8th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, 2014 June, Mielparque-Yokohama, Yokohama
- (4) Yamaoka N, Ikoma T, Yoshioka T, Tanaka J, Preparation method of porous composites of hydroxyapatite and tilapia scale collagen for artificial bone”, The 8th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, 2014 June, Mielparque-Yokohama, Yokohama
- (5) Minemoto M, Yoshioka T, Ikoma T, Tanaka J, “Influence of poly(ethylene glycol) and gamma-ray irradiation to mechanical property of apatite-collagen composite”, The 8th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, 2014 June, Mielparque-Yokohama, Yokohama
- (6) 峯元誠也、吉岡朋彦、生駒俊之、田中順三、“水酸アパタイト/コラーゲン複合体へのポリエチレングリコールジアクリレートによる架橋”,日本セラミックス協会第 27 回秋季シンポジウム、2014 9 月、鹿児島大学、鹿児島
- (7) Yamaoka N, Ikoma T, Tanaka J, “Fabrication of functionally gradient porous artificial bone of hydroxyapatite and tilapia scale collagen nanocomposites”, The 14th Asian BioCeramic Symposium, 2014 Oct, Rainbow Hotel, Shanghai
- (8) Watanabe R, Xu ZF, Yoshioka T, Ikoma T, Kashiwazaki H, Tanaka J, “Effective composite of polyphosphate for regeneration material”, The 14th Asian BioCeramic Symposium, 2014 Oct, Rainbow Hotel, Shanghai
- (9) Ikoma T, Tanaka J, Type A carbonateapatite, its structure predicts biomedical applications”, The 14th Asian BioCeramic Symposium, 2014 Oct, Rainbow Hotel, Shanghai
- (10) Hirosawa S, Tanaka J, Ikoma T, Yoshioka T, “Fabrication of oriented tilapia fish scale collagen under flowing fluid”, The 7th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, 2013 June, Mielparque-Yokohama, Yokohama
- (11) Watanabe R, Xu ZF, Yoshioka T, Ikoma T, Tanaka J, “Deposition of calcium phosphate crystals onto fibrous membranes of polyphosphate fish scale collagen”, The 7th International Conference on the Science and

Technology for Advanced Ceramics, 2013 June, Mielparque-Yokohama, Yokohama

(12) Kawamura K, Yoshioka T, Ikoma T, Uemura T, Tanaka J, "Preparation of tilapia scale collagen/chondroitin sulfate fibrous membranes for tissue engineering, The 7th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, 2013 June, Mielparque-Yokohama, Yokohama

(13) Ikoma T, "Physicochemical property of collagen extracted from fish scales", The 3rd International Symposium on Human Resource Development towards Global Initiative, 2013 Dec, Thailand

(14) Ikoma T, Xu ZF, Yoshioka T, Tanaka J, Tissue engineering approach using hydroxyapatite/fish scale collagen composites", Termis Asia, 2013 Oct, Wuzhen hotel, Shanghai

(15) 田中利明, "分子細胞生物学的手法に関する研究：魚鱗コラーゲン公示構造構築の試み、第29回コラーゲン研究会、2013年7月、クラレ、倉敷

(16) 廣澤聡太、吉岡朋彦、生駒俊之、田中順三、"流れ場を用いて配向させたテラピア鱗由来コラーゲン線維膜の作製"、日本セラミックス協会 2013 年年会、2013 年 3 月、東工大、大岡山

(17) 滝澤友里、辺穎、小山遼、楊宇、駒田雅之、福光寛、中尾祥絵、皆川香織、山岡華児、住吉秀明、稲垣豊、喜多村直実、田中利明、"Hepatocyte growth factor(HGF)による細胞増殖制御機構の解明"、第19回肝細胞研究会、2012年6月、北大、札幌

(18) 田中利明、"哺乳類由来不死化遺伝子による金魚うろこ細胞の株化について"、第25回コラーゲン研究会、2012年7月、北大、札幌

(19) Takahashi S, Toyoda A, Kuroki Y, Uno Y, Izutsu Y, Suzuki A, Michiue T, Ogino H, Ochi H, Tanaka T, Fukui A, Ito Y, Ueno N, Asahima A, Matsuda Y, Taira M, Fujiyama A, "Analysis of the xenopus laevis J-strain genome by BAC end sequencing, FISH, and RNA-sequence, The 14th International Xenopus Conference, 2012 Sep, Giens Peninsula, South of France

(20) 辺穎、滝澤友里、李曉然、駒田雅之、喜多村直実、田中利明、"肝細胞増殖因子 HGF による肝癌細胞株 HepG2 の不可逆的な増殖停止誘導におけるヒストン H3K9 のメチル化局在変化の解析"、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月、福岡大学、福岡

(21) 田中利明、"新規 Cdk インヒビター Ink4X によるツメガエル初期発生関連 mRNA の翻訳制御"、第7回長野ミーティング 2013 年 2 月、白馬ホテル、白馬八方

〔図書〕(計 1 件)

(1) 生駒俊之、杉浦弘明、吉岡朋彦、近藤英司、安田和則、田中順三、"アンチエイジングシリーズ3 骨研究最前線"、株式会社エ

ヌ・ティー・エス、2013 年 p.10

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.ceram.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生駒 俊之 (IKOMA, Toshiyuki)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：20370306

(2) 研究分担者

田中 順三 (TANAKA, Junzo)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：10343831

田中利明 (TANAKA, Toshiaki)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号：40263446

吉岡朋彦 (YOSHIOKA, Tomohiko)

東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：50452016