

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700478

研究課題名(和文) 生体軟組織の再生を目的としたコラーゲン多層構造体の構築

研究課題名(英文) Preparation of the multi-layered collagen structure for tissue reconstruction

研究代表者

南 広祐 (Nam, Kwangwoo)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：70447499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンは人体組織の基本構成物質であり、優れた生物学的特性を有するため、種々な形で作製され人工臓器および組織工学分野で応用されている。本研究では、皮膚、角膜などの生体組織の代替物として使用するため、コラーゲン繊維とポリマーの複合体を作製することにより組織工学および再生医療分野で使用可能な新規バイオマテリアルを完成することを目的とした。そのため、生体組織と同じ物理的・生物学的機能の再現を目的とし、水溶液中での塩によるコラーゲン繊維化現象を利用し、細胞外マトリクス(ECM)と類似構造を有する人工コラーゲン組織体の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Collagen is the basic component of the human tissue. Since the collagen has excellent biological properties, it is manufactured in various forms and is applied for preparing artificial organs or scaffold for the tissue engineering. In this project, I aimed to prepare a substitute for living tissues such as cornea or skin. The basic strategy is to construct a artificial extracellular matrix which possesses similar structure to that of a native tissue. This was executed based on the fibrillogenesis of the collagen molecules and complex formation. Through this study, it was clear that the collagen matrix with fibril structure which is very similar to the native tissue can be obtained. Furthermore, The collagen matrix with high density could be obtained. With this, the collagen microspheres which can form complex with the cells were prepared. By preparing collagen microspheres with fibrils, it was possible to prepare collagen-cell complex in vitro.

研究分野：組織工学

キーワード：コラーゲン グルコサミノグリカン 微粒子

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療や組織工学分野では、細胞接着性や生体に近い物性を有するコラーゲンの幅広い応用が検討されている。しかし、コラーゲンは機械的な物性が弱く、また生体内では収縮する特徴をもっているため、広汎な応用には限界がある。そこで、これらの問題を克服した高強度で、寸法安定性を有し、さらに生体組織と同様の物理特性と生物学的特性を有するコラーゲンおよびコラーゲンマトリクスの開発が望まれている。生体内では、心膜、羊膜、腹膜など薄くて高強度のコラーゲンを主成分とした膜と臓器が存在する。生体組織は癒着防止と摩擦軽減機能を有し、これらの特性を生かして心膜は心臓弁の形成に、羊膜は被覆材や角膜上皮再生の基材として用いられている。一方、心膜や羊膜などの生体由来材料は提供の不足や感染症の可能性などの問題点があり、代替品の開発が求められている。

そこで、生体組織の微細構造から収縮力に対抗する膨潤力を有する第2成分(生体膜の場合は多糖類)を複合化したフィルムを製作し、生体組織と同様の多層構造を形成できれば、生体膜と同様の特性が得られると考えた。また、コラーゲン組織体の配向などの構造制御を行うことで、より高機能化された人工組織の作製が可能になり、組織工学や再生医療用材料として期待される。

## 2. 研究の目的

コラーゲンは生体内で様々な分子間相互作用して、皮膚、腱、骨などの生体組織を構築している。一般的にコラーゲンは低強度、低寸法安定性であり、物的に生体組織に大きく劣っている。これらの解決法が検討されており、医療用途では一定の成果をあげているものの、高度な機能が要求される再生医療等では問題解決に至っていない場合が多い。

コラーゲンの分子制御から、目的とした

化学的・物理的および生物学的特性を得ることを目指し、組織工学および再生医療分野に応用可能なバイオマテリアルの設計に挑む。具体的には、コラーゲン分子の構造制御を行うことによりポリマー、多糖類などの第2成分を複合化し、生体組織の代替品を開発する。収縮するコラーゲンと膨潤する第2成分を適正な方法で架橋することで複合体を作製する。コラーゲンと第2成分の複合体の作製技術を確保することにより、様々な分野に応用することが可能であると期待される。また、コラーゲン組織体の構造コントロール、コラーゲンマトリクスの高濃度化による高機械的な物性の獲得、低炎症性3次元細胞培養用マトリクスの開発を行い、生体組織の機能を再現することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では生体組織に限りなく近い人工組織を作製するために、コラーゲン繊維化現象を利用した研究を行った。材料として型コラーゲン水溶液(5 mg/mL、ウシ真皮酸可溶性コラーゲン)を用いて条件を調節して目的に合わせてコラーゲン繊維マトリクスを作製した。その技術としてコラーゲン分子の生理食水での再配列によるコラーゲン繊維化現象を用いた。細部達成目標実験方法として 1)コラーゲン-グルコサミノグリカン(GAGs)の複合化、2)コラーゲン繊維組織の高密度化によるフィルムの作製、3)3次元培養を目的としたコラーゲン細胞の複合化を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) コラーゲンと GAGs の繊維化と複合化

生理条件で形成される繊維は生体コラーゲンと同様、規則的なフィブリルバンドを有している。即ち、GAGs は繊維化過程で排除され、コラーゲン繊維が先に形成された後、GAGs との静電的相互作用が行われる。唯一の例外はヘパリンであった。ヘパリンの場合、強い静電的相互作用が行われ、コラーゲンと

の繊維形成がコラーゲン自己組織より先に  
行われる。この場合、生理条件で形成された  
繊維は水溶液中に広く分散され、凝集する他  
のサンプル異なる形状を示した。

生理条件でコラーゲンとGAGsの混合に  
よるゲル化挙動をより詳しく検討するため、  
光学濃度変化を測定した。GAGsを導入した  
場合、複合化によりゲル化速度が速くなるこ  
とを見出した。また、ヒアルロン酸(HA)と  
コンドロイチン(CS)の濃度が低下するとそ  
のゲル化速度が遅くなることを確認した。こ  
れは、GAGsによる影響である。一方、ヘパ  
リンを導入した場合はヘパリン濃度が高く  
なるとある時間後、光学濃度が再び上昇す  
ることを見出した。これは、ヘパリンの強い陰  
イオン性に起因するものの、コラーゲンと相  
互作用により複合体生じ、短時間で不透明さ  
れるものの、徐々にヘパリンが排除され、コ  
ラーゲンの繊維化が行われることを意味す  
る。ヒアルロン酸とコンドロイチンとの複合  
化の場合、コラーゲンから早期にGAGsが排  
除され繊維化が進められることであると考  
えられる。

コラーゲン - GAGs の相分離は架橋剤が  
必要であることを意味する。コラーゲン繊維  
- GAGs 複合体ゲル(0.5wt%と2wt%)にEDC  
を導入し、架橋して作製した結果、水溶液で  
安定なゲルが得られた。HA及びCSを導入した  
場合、複合化ゲルは白くなる。その構造を  
AFMとSEMで観察した結果、コラーゲンの  
自己組織化によりフィブリルバンドを有す  
る緻密な繊維で構成されていることを確認  
した。しかし、ヘパリンを導入した場合、複  
合化ゲルは透明になることが分かった。ヘパ  
リンを添加したコラーゲン複合化ゲルでは、  
コラーゲン繊維の形成が見られなかった。

コラーゲン繊維と反応するGAGsの量は  
少なく、複合化されたゲルの約5wt%である。  
大量のGAGsを導入しても複合化ゲルの中の  
量は大きく変わらない(2wt%~5wt%)。た  
だし、ヘパリンの場合、相分離が遅いため、複  
合化ゲル内でのヘパリン量は約5wt%~

14wt%まで分布されており、その結果、コラ  
ーゲン - ヘパリン複合化ゲルの物理的特性  
に影響すると考えられる。

2wt%の繊維化コラーゲン複合体ゲルの  
機械的物性を測定した結果、純粋なコラーゲ  
ン繊維ゲルと比較し、ヘパリンの添加は機械  
的物性の増加が確認された。これは、コラー  
ゲン分子とヘパリン分子のインターカレー  
ション効果であると考えられる。コラーゲン  
とヘパリンは分子間複合化が行われ架橋さ  
れたため、ゲルに近い物性を示している。一  
方、他の複合化ゲルの場合は純粋なコラーゲ  
ン繊維ゲルと有意差は見られなかったもの  
の、圧縮によるゲルの崩壊がなく、100%修復  
した。これは、これらの複合化ゲルは繊維化  
構造により外部ストレスに対して吸収力を  
有していることを意味する。この繊維化コラ  
ーゲン複合体ゲル、新しい細胞操作技術とし  
て再生医療などへの応用が期待される。

## (2) コラーゲンマトリクスの高密度化

本研究室では、細胞外マトリクスのコラ  
ーゲン濃度は30wt%達しており、物理・生物  
学的特性の発現に重要な役割を担っている  
ことと、細胞外マトリクスの構造に着目し、  
細胞外マトリクスと同様の構造有し、高濃度  
コラーゲンマトリクスの作製に取り組んだ。  
ここで条件として架橋剤を使わずに、コラ  
ーゲン分子の自己組織化挙動を利用すること  
でコラーゲン分子間相互作用を制御し、より  
生体組織に近い組織体の作製に取り組んだ。  
コラーゲン水溶液(0.5wt%および2wt%)を  
透析カセットの中に注入し、PEG水溶液の中  
に入れ、5日間透析を行った。得られた透明  
な高濃度コラーゲンゲル(THCゲル)を水で  
洗った後、膨潤を抑制するため、エタノール  
で保存した。エタノールでの保存によるマト  
リクスの変化は見られなかった。

また、繊維化されたコラーゲンゲルを得  
るため、NaCl 0.9wt%水溶液にPEGを溶解さ  
せたPEG-NaCl水溶液にコラーゲン水溶液を  
5日間透析した。得られた高濃度繊維化コラ  
ーゲンゲル(OHCゲル)を水で洗った後、エ

タノールで保存した。これは、THC ゲルと同様コラーゲンの吸水を防ぐ目的である。OHC ゲルは最高 30wt%のコラーゲンを含有することが分かった。THC ゲルの場合、コラーゲンを含有率が 20wt%に達した。THC ゲルと OHC ゲルはコラーゲン水溶液に含まれていた塩酸が除去されゲル化すると考えられる。OHC ゲルの場合、NaClの影響により繊維化が行われ、白濁した。この白濁は、透析によるコラーゲンマトリクスの作製と同様の現象である。脱水化と NaCl によるコラーゲン分子の再配列が行われ、繊維化する。THC ゲルに比較し、OHC ゲルが高濃度である理由は究明されていないものの、繊維化も脱水化過程の一つであるので、OHC の繊維化過程で行われる脱水化は浸透圧と繊維化による脱水化が同時に行われたことであると思われる。

SEM と AFM で観察した結果を Figure 1 に示した。繊維化が見える OHC と比較し(左下) THC では繊維化は見られなかった。しかし、脱水化過程中、コラーゲン分子の再配向が行われ、分子配列が発生することを確認した(右)。これは、分子間距離が脱水化とともに縮むことに起因する。透析膜中のコラーゲン分子が自己組織化により配列する。しかし、繊維化された OHC ゲルの場合、織

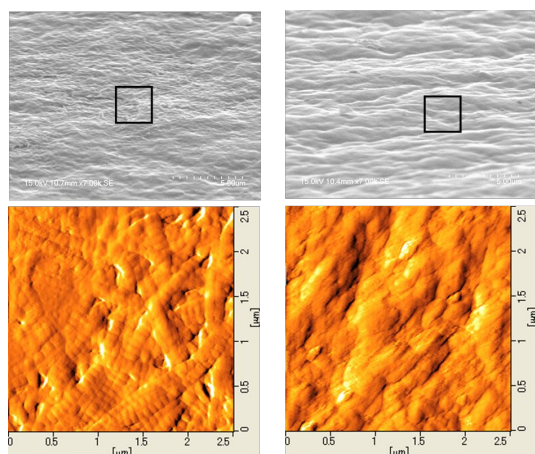


Figure 1. THC ゲル(左)と OHC ゲル(右)の表面構造。SEM(上)と AFM(下)映像。

維の再配列による繊維構造の再構築は観察されていなかった。

引張挙動を検討した結果、すべてのゲルにおいて 100%以上延伸することが分かった。

圧縮強度試験でも皮膚に近い圧縮強度を有していることを確認した。架橋剤を使用していないので、脆性が出ず、ゴムのような特徴を有している。

生体組織に近いコラーゲン濃度を有するコラーゲンマトリクスの作製に成功した。架橋剤を使わずに、安定で高機械的物性を有しており、脱水化により薄いフィルムに加工できる。THC の場合、コラーゲン繊維構造を有していることから、心膜、羊膜のような特徴を再構築できることが期待される。

### (3) コラーゲン繊維化を応用した微粒子化

本研究では W/O 型エマルション法により架橋剤を用いたコラーゲン微粒子(CMS)の作製条件を検討し、この結果に基づいて繊維型コラーゲン微粒子(fCMS)の作製条件を検討した。CMS においては架橋剤によって液滴の球形を維持したまま固体化させ微粒子を形成させた。一方、fCMS の調製では、架橋剤を使用せずにコラーゲン分子の自己組織化させ、繊維形成で固体化させた。生理食塩水とコラーゲン水溶液を 1:1 の割合で混合することにより、生理条件に合わせ、コラーゲン分子のより自己組織化による繊維形成を誘発した。そのため fCMS の作製方法において、油相に分散させる前に 1.8% NaCl/0.04M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液とコラーゲン水溶液を混合した。乳化剤として非イオン性の乳化剤を用いて、親水性と親油性のバランスを示した HLB 値をもとに CMS および fCMS 形成への影響を検討した。乳化剤濃度は、回収率および粒子径の均一性が高い 1vol%を乳化剤濃度として用いた。CMS においては比較的強固な架橋反応により、HLB 値に関わらず油相に分散した液滴が球形を維持したまま固体化し微粒子が形成されたと考えられる。生理条件での繊維化効果が fCMS に観察された。

fCMS においては HLB 値による液滴の安定性が微粒子形成に大きく影響した。fCMS においては、HLB 値 9.0 以下において微粒子が形成した。これは、液滴中でコラーゲン分子が自己組織化により繊維を形成するので、

液滴の安定性は非常に重要であることを意味する

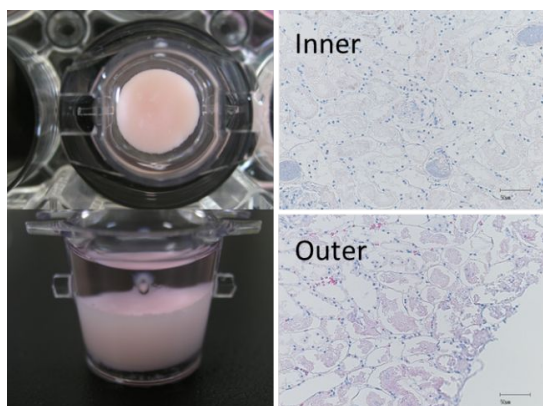


Figure 2. fCMS と混合し、培養した細胞とコラーゲン映像(14 日目)。細胞との具供御羽化によりマトリクスが安定した。

fCMS の形状安定性と平均粒子径において、温度依存性がみられた。25 での調製の場合、形成した微粒子が洗浄操作後に崩壊した。調製温度の上昇とともに、より安定した fCMS の調製が可能であり、37 においては一部での粒子の融合が観察された。25 における自己組織化の進行が遅く、コラーゲン繊維の形成が不十分であったと考えられる。温度が高くなると形成された fCMS の安定性が増加し、平均粒子径が増大したことから、形状安定性評価から作製した fCMS は生体内により近い環境において安定性が高く、生体で分解が遅い材料であることが示唆された。

攪拌速度が増加すると攪拌により生じるせん断応力が增大するため、攪拌速度の増加に伴い形成された微粒子の平均粒子径が減少したと考えられる。さらに fCMS 形成挙動から、攪拌速度が液滴の安定性に大きく影響することを見出した。液滴の安定性が高い HLB 値 9.0 の乳化剤を使用した場合にも、攪拌速度が 900 rpm 以上においては形成された微粒子表面におけるフィブリルバンドの形成が不完全であった。そこで、細胞培養用 fCMS の条件として HLB 値：9.0、乳化剤濃度：1vol%、温度：30、攪拌速度：600rpm を選択し、実験を行った。

これらのコラーゲン微粒子の表面に細胞を培養した結果、CMS 上では細胞が増殖する

ものの、fCMS 上では表面での接着が見られず、ネットワークのような増殖挙動を示した。その理由はいまだに理解されていないものの、表面構造の違いにより細胞挙動が変化したと考えられる。細胞培養期間を 2 週間まで延長した結果、fCMS の場合、細胞ネットワークによりゲルのようなマトリクスが形成されていることを発見した (Figure 2)。そのマトリクスの内部まで細胞が存在していることを確認した。これは、この fCMS を生体内に注射した場合 fCMS の周辺に細胞が集まり、粒子の間に細胞が浸透し、ネットワークを形成することを示唆する。すなわち、損傷された生体組織の修復に非常に有利であると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Matsushashi A, **Nam K**, Kimura T, Kishida A, Fabrication of fibrillized collagen microspheres with the microstructure resembling an extracellular matrix, *Soft Matter*, 査読有, Vol. 11, 2015, 2844–2851 (DOI: 10.1039/C4SM01982B) .
- 2) **Nam K**, Seo J-H, Kimura T, Yui N, Kishida A. Relationships between molecular mobility, fibrillogenesis of collagen molecules, and the inflammatory response: An experimental study *in vitro* and *in vivo*. *J Coll Biointerf Sci*, 査読有, Vol. 433, 2014, 16-25 (DOI: 10.1016/j.ccis.2014.06.107)

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) **Nam K**, Matsushashi A, Kimura T, Kishida. Preparation of the fibrillized collagen microparticle and evaluation of physical and biological properties TERMIS-AM, 12 月, 2014 年, Washington D.C. USA.

- 2) **Nam K.**, Kimura T, Kishida A. Preparation of fibrillized collagen-glycosaminoglycan complex gel for tissue regeneration templates, Polymer Networks Group Meeting and the Gel Symposium 2014, 11 月, 2014 年, Tokyo.
- 3) **Nam K.**, Kimura T, Kishida A. Preparation of an artificial skin by replication of its native structure using collagen-GAG complex, Society for Biomaterials, 4 月, 2014 年, Denver, USA.
- 4) **Nam K.**, Matsushima R, Shimatsu Y, Kimura T, Fujisato T, Kishida A. Preparation and characterization of a decellularized dermis-polymer complex for the use in percutaneous devices Society for Biomaterials, 4 月, 2014 年, Denver, USA.
- 5) **Nam K.**, Seo J.H, Kimura T, Yui N, Kishida A. Investigation of interaction between the dynamic polymer surfaces and collagen molecules, USA, 4 月, 2013 年, Society for Biomaterials, Orlando.
- 6) 松橋亜希, **南 広祐**, 木村 剛, 岸田晶夫, W/O 繊維型コラーゲン微粒子の作製と特性評価, 第 24 回ライフサポート学会フロンティア講演会, 3 月 2015 年, 東京。
- 7) **南 広祐**, 木村 剛, 岸田晶夫, 高濃度コラーゲンマトリクスの作製と物理的特性評価, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 11 月, 2014 年, 東京。
- 8) 松橋亜希, **南 広祐**, 木村 剛, 岸田晶夫, W/O 型エマルション法によるコラーゲン繊維微粒子の作製と評価, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 11 月, 2014 年, 北海道。
- 9) **K Nam**, A Matsuhashi, T Kimura, A Kishida Preparation of the fibrillized collagen microparticle possessing similar native tissue microstructure using W/O emulsion technique, 第 63 回高分子討論会, 9 月, 2014 年, 長崎。
- 10) **南 広祐**, 木村 剛, 岸田晶夫繊維化コ

ラーゲン複合体ゲルの作製とその機能評価, 第 63 回高分子討論会, 9 月, 2014, 長崎。

- 11) 松橋亜希, **南 広祐**, 木村 剛, 岸田晶夫生体組織と同様のミクロ構造を有するコラーゲン繊維微粒子の作製と評価, 第 65 回コロイドおよび界面化学討論会, 9 月, 2014 年, 東京。
- 12) **Nam K.**, Kimura T, Kishida A. Preparation of tissue regeneration templates based on fibrillized collagen-glycosaminoglycan complex gel, 第 63 回高分子年次会, 5 月, 2014 年, 名古屋。
- 13) 松橋亜希, **南 広祐**, 木村 剛, 岸田晶夫, 薬物徐放を目的としたコラーゲン線維微粒子の作製条件検討, 第 23 回ライフサポート学会フロンティア講演会, 2 月, 2014 年, 東京、
- 14) **南 広祐**, 木村 剛, 岸田晶夫, コラーゲン繊維 - GAG 複合体ゲルの作製とその機能の検討, 第 62 回高分子討論会, 9 月, 2013 年, 金沢。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

無し

〔その他〕

ホームページ等

無し

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 南 広祐 (NAM, Kwangwoo)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教  
研究者番号: 70447499