

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350519

研究課題名(和文) 生体組織の力学的適応におけるコラーゲン分子間の力学的相互作用の解明

研究課題名(英文) Effects of the mechanical interactions between collagen molecules on the mechanical adaptation of biological tissues

研究代表者

山本 憲隆 (YAMAMOTO, Noritaka)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：40210546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン溶液から再構成した原線維とコンドロイチン硫酸Bの相互作用を水晶振動子マイクロバランス(QCM)を用いて解析した。その結果、コンドロイチン硫酸Bには、コラーゲン原線維同士を結合する作用があることが明らかになった。また、再構成コラーゲン原線維の引張試験と微視的構造観察を行った。その結果、再構成原線維は、腱を構成している原線維と同等の力学的性質と微細構造を有することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Collagen fibrils were reconstituted in vitro from collagen solution. The interaction between the reconstituted collagen fibrils and chondroitin sulfate B was analyzed using a quartz crystal microbalance (QCM). The obtained results indicate that chondroitin sulfate B is effective on the bonding of collagen fibrils. The tensile test and microscopic observation of reconstituted collagen fibrils were performed. Their tensile properties and microstructures were equal to those of native collagen fibrils of tendons.

研究分野：生体工学

キーワード：バイオメカニクス 生体分子 細胞・組織 再生医学

1. 研究開始当初の背景

生体組織は力学的環境の変化に対して、形態や力学的性質を変化させて適応（リモデリング）することが知られている。そこで、我々は、ウサギの膝蓋腱に作用している負荷を外科的手術により増減させると、これに対応して膝蓋腱の力学的性質も変化することを明らかにした。また、ヒト膝蓋腱の力学的性質を超音波診断装置を用いて計測し、作用する負荷が大きくなるとそれに伴って膝蓋腱の弾性係数が大きくなることを明らかにした。このように、独自の実験モデルや診断方法を開発して、マクロなレベルでの適応現象について、詳細なデータを蓄積している。

また、力学的適応のメカニズムを解明するために、ミクロなレベルからの研究も行っている。腱や靭帯は、コラーゲン線維束、線維、原線維、サブフィブリル、マイクロフィブリルの順で微細となり、最終的にコラーゲン分子に至る。そこで、我々は、ウサギ、ラット、マウスの腱や靭帯から直径 100~300 μm の線維束を摘出して、引張試験を行ない、力学的性質を調べた。さらに、暗視野観察法により原線維を可視化し、マイクロマニピュレータでマイクロ針に原線維を巻き付ける方法を独自に開発し、直径 100~500nm の原線維の引張試験を可能にしている。

以上の研究を通して、腱や靭帯を構成する微細構成要素であるコラーゲン原線維が、腱や靭帯の力学的性質を決定する重要な因子であることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、力学的適応のメカニズムを分子レベルから解明するための研究基盤を確立することである。具体的な研究項目は、①腱から抽出したコラーゲン分子から原線維を再構成させる、②再構成過程におけるコラーゲン分子間の力学的相互作用を水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いて解析する、③再構成された原線維の力学的性質と微細構造を明らかにする、の3点である。以上の結果から、再構成過程においてコラーゲン分子に作用した力学的刺激と再構成された原線維の力学的性質の関係について検討した。

3. 研究の方法

(1) 再構成コラーゲン原線維とコンドロイチン硫酸の相互作用の解析：本研究では、コラーゲン原線維とコンドロイチン硫酸 B、あるいはコラーゲン原線維同士の相互作用について、QCM と原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて検討した。

①試料：ブタ腱由来の酸可溶性 Type I コラーゲン溶液 (0.3mg/ml, pH 3.0, Cellmatrix Type I-A, A 液, 新田ゼラチン) と再構成用緩衝液 (260mM NaHCO₃ および 200mM HEPES を含む 50mM NaOH 溶液, B 液, 新田ゼラチン) を用いた。Cellmatrix Type I-A は酸性で、アルカリ性の再構成用緩衝液と混合することによ

って中性に近づき、コラーゲン原線維が再構成される。これらに加え、ブタ皮膚由来のコンドロイチン硫酸 B (生化学工業, 0.23mg/ml) を使用した。

②QCM：計測には QCM (QCM934, セイコー・イメージアンドジー) を用いた。QCM は、水晶振動子の圧電効果を利用して、水晶振動子表面で起こる微小な質量変化を共振周波数変化から測定できる装置である。水晶振動子の両側に金属電極を蒸着し、交流電圧を印加すると、水晶振動子は圧電効果により共振振動を起こす。共振周波数は水晶振動子表面で起こる物質の吸着や溶解に伴い変化するので、この変化は質量変化に換算できる。質量変化 Δm と共振周波数の変化 ΔF の間には、以下の Sauerbrey 式が成り立つ。

$$\Delta F = -2 n F_0^2 \Delta m / (A \mu_q^{1/2} \rho_q^{1/2})$$

ここで、 F_0 ：基本振動周波数 (9MHz: $9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$)、 n ：オーバートーン次数 (3)、 A ：電極面積 (0.196 cm^2)、 μ_q ：水晶のせん断応力 ($2.947 \times 10^{11} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$)、 ρ_q ：水晶の密度 ($2.648 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) であるので、

$$\Delta m / \Delta F = -356 (\text{pg} / \text{Hz})$$

となる。この式を用いて共振周波数の変化量から再構成量を算出した。

③コラーゲン原線維同士の反応：37°C に設定された恒温槽内に、水晶振動子 (QA-A9M-AU) を装着したウェル型セル (QA-CL4) を設置した。その後、コラーゲン溶液 (A 液) をセルのカップ部にマイクロピペットを用いて 160 μl 滴下した。次に、再構成用緩衝液 (B 液) を 40 μl 滴下して、コラーゲン原線維を再構成させた。得られた周波数の変化量からコラーゲン原線維の再構成量を算出した。この水晶振動子を蒸留水で洗浄・乾燥させ、AFM (Nanocute, 日立ハイテクサイエンス) を用いて観察した。その後、同量のコラーゲン溶液と再構成用緩衝液を再び滴下して、コラーゲン原線維同士を反応させた。

④コラーゲン原線維とコンドロイチン硫酸 B の反応：③の手順と同様にコラーゲン原線維を再構成し、この上からコンドロイチン硫酸 B を 160 μl 滴下した。その後、同様にコラーゲン原線維の再構成とコンドロイチン硫酸 B の反応を繰り返した。

(2) コラーゲン原線維の再構成に及ぼす溶液流れの影響：本研究では、コラーゲン溶液に流れを与えた状態で再構成した原線維の再構成量を QCM で測定し、原線維の微細構造に及ぼす溶液流れの影響について検討した。

①試料：(1)の試料と同様に、ブタ腱由来の酸可溶性 Type I コラーゲン溶液と再構成用緩衝液を用いた。

②流れを与えた実験：37°C に設定された恒温槽内に、水晶振動子 (QA-A9M-AU) を装着したフロー型セル (QA-CL6) を設置し、チューブを取り付けた。水晶振動子のリード

線は QCM 本体に接続した。コラーゲン溶液 (A 液) と再構成用緩衝液 (B 液) を混合し、チューブポンプを用いてチューブを通してセルに流し、水晶振動子にコラーゲン原線維を吸着させた。使用した A 液と B 液の量の比は 4 対 1 とした。その後、この水晶振動子を蒸留水で洗浄・乾燥させ、SEM (Miniscope TM3030Plus, 日立ハイテクノロジーズ) と AFM を用いて観察した。

(3) 再構成コラーゲン原線維の微細構造と力学的性質：本研究では、コラーゲン溶液から自己組織化により原線維を再構成させ、得られた原線維の微細構造を AFM を用いて観察するとともに、原線維の引張試験を行ない力学的性質を明らかにした。

①**試料**：ブタ腱由来の酸可溶性 Type I コラーゲン溶液 (Cellmatrix Type I-A) を用いた。この溶液 1ml 中には、pH3.0 の酸性で、3mg のコラーゲンが分子の状態分散している。これを希塩酸 (pH3.0) で 10 倍に希釈した。この溶液をスライドガラス上にマイクロピペットを用いて 10 μ l 滴下した。次に、再構成用緩衝液を 2.5 μ l 滴下して、上からもう 1 枚のスライドガラスを重ねて荷重をかけた後、これを取り除き、37 $^{\circ}$ C に設定した恒温槽内に 30 分間入れて原線維を再構成させた。得られた試料の微細構造を倒立顕微鏡 (IX71, オリンパス) の暗視野および AFM で観察した。

②**引張試験**：引張試験は、倒立顕微鏡 (IX71, オリンパス) のステージ上で、暗視野観察下で行った。スライドガラス上に展開した試料から、マイクロマニピュレーター (MM-89, MMO-202N, ナリシゲ) に取付けたマイクロ針を用いて、原線維単体を取り上げた。この原線維の他端をもう一本のマイクロ針の先端に吸着させ、マニピュレーターを操作して、原線維の両端をマイクロ針に巻き付けた。このとき、マイクロ針と原線維のすべりを防止するために、最初に巻き付けた原線維の上に次に巻き付ける原線維が重なるように数回巻き付けた。原線維とマイクロ針の先端を生理食塩水中に 3 分間浸漬した後、引張試験を行った。一方の針は静止させたままで、もう一方の針は原線維が破断するまでマニピュレーターを用いて移動させた。顕微鏡画像を CCD カメラを用いて DVD レコーダに録画し、原線維の長さおよびマイクロ針のたわみを画像解析装置 (XL-20, オリンパス) を用いて計測した。

原線維に作用した荷重はマイクロ針のたわみから求めた。実験に使用するマイクロ針をマニピュレータに取り付け、その先端を電子天秤 (UMX2, メトラートレド) の計量皿上に設置した直径 1mm のガラス棒に押し当てた。このときの針のたわみをビデオマイクロスコープで計測し、荷重を電子天秤の表示値より読み取った。得られた荷重とたわみの関係から、原線維に作用した荷重を求めた。

引張試験後、マイクロ針の先端を SEM で観察し、針に付着した破断後の原線維の直径を測定し、円近似により断面積を求めた。

原線維に作用した応力は、原線維に作用した荷重を断面積で割ることにより算出した。原線維のひずみは、録画した画像より原線維の伸びを計測して算出した。得られた結果から、応力-ひずみ曲線を決定し、0 点と破断点の間で求めた近似直線の傾きより接線弾性係数を決定し、原線維が破断したときの応力 (引張強度) とひずみ (破断ひずみ) を求めた。

(4) 再構成コラーゲン原線維の力学的性質に及ぼすテロペプチドの影響：本研究では、再構成原線維の力学的性質に及ぼすテロペプチドの影響を明らかにするために、分子の両末端にテロペプチドを持つ酸可溶性コラーゲン溶液とテロペプチドを持たないペプシン可溶性コラーゲン溶液から再構成した原線維の引張試験を行い、それらの力学的性質について比較・検討した。

①**試料**：ブタ腱由来の酸可溶性 Type I コラーゲン溶液 (Cellmatrix Type I-A) とブタ腱由来のペプシン可溶性 Type I コラーゲン溶液 (Cellmatrix Type I-P) を用いた。これを希塩酸 (pH3.0) で 10 倍に希釈した。この溶液をスライドガラス上にマイクロピペットを用いて 6 μ l 滴下した。次に、再構成用緩衝液を 1.5 μ l 滴下して、上からもう 1 枚のスライドガラスを重ねて荷重をかけた後、これを取り除き、37 $^{\circ}$ C に設定した恒温槽内に 30 分間入れて原線維を再構成させた。

②**引張試験**：引張試験は(3)と同様の方法で行った。

4. 研究成果

(1) 再構成コラーゲン原線維とコンドロイチン硫酸の相互作用の解析：図 1 にコラーゲン原線維同士の反応 (3. (1)の③参照) で得られたコラーゲン原線維の吸着量を示す。1a に比べて、2a, 3a で減少し、約 250ng となった。図 2 にコラーゲン原線維とコンドロイチン硫酸 B の反応 (3. (1)の④参照) で得られたコラーゲン原線維とコンドロイチン硫酸 B の吸着量を示す。図 1 と比べると図 2 のコラーゲン原線維の吸着量は 2a, 3a で約 160ng 増加した。

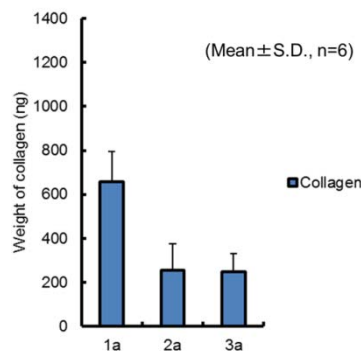


図 1 コラーゲン原線維の吸着量。

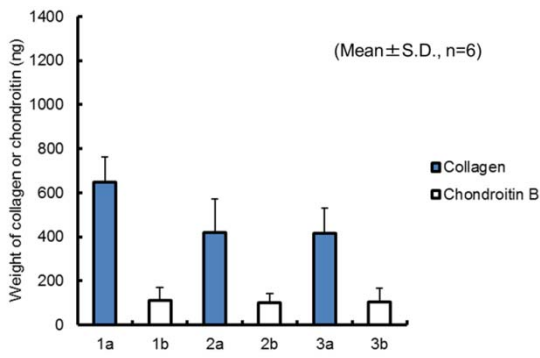


図2 コラーゲン原線維とコンドロイチン硫酸 B の吸着量.

図3, 4にAFM画像の一例を示す. 図3では原線維特有の周期構造が観察できたのに対して, コンドロイチン硫酸Bを繰り返し吸着させた図4ではコラーゲン原線維特有の周期構造は観察されなかった. これらのことから, コンドロイチン硫酸Bにはコラーゲン原線維とコラーゲン原線維を結合する作用があると考えられる. また, コンドロイチン硫酸Bが表面に吸着したため, 原線維特有の周期構造の谷の部分が無くなり, コラーゲン原線維特有の周期構造が見られなくなったと考えられる.

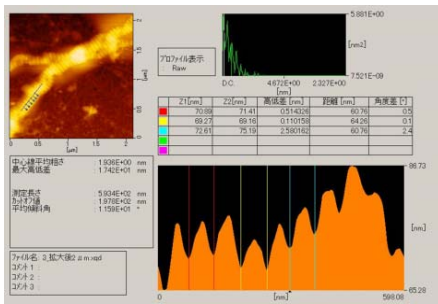


図3 AFM画像 (図1の3a).

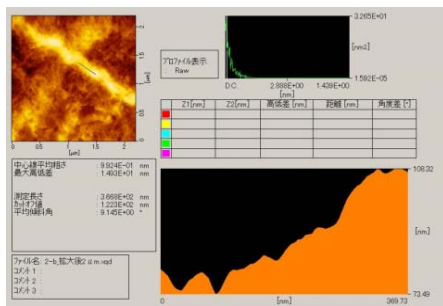


図4 AFM画像 (図2の2b).

(2) コラーゲン原線維の再構成に及ぼす溶液流れの影響: コラーゲン濃度 0.3 mg/ml の実験では, 流速 0 ml/h に比べて流速 17, 34 ml/h では吸着量に大きな変化は見られなかったが (図5), 濃度 0.03 mg/ml の実験では, 流速 0 ml/h に比べて流速 18, 35 ml/h で吸着量が増大した (図6). 濃度が 0.03 mg/ml と低い場合には, 流速 0 ml/h ではセルのカップ内でコラーゲンのゲル化が起こり, 水晶振動子近傍で再構成された原線維しか吸着できないが, 流れを与えると常に原線維が供給されるために吸着量が増加したと考えられる. 本実験で使用した水晶振動子に吸着可能なコラーゲン

量には限界があり, 約 800 ng である. 流速 18, 35 ml/h では, 吸着量がほぼこの限界値に達している. 一方, 濃度が 0.3 mg/ml と高い場合には, 水晶振動子近傍での原線維の再構成量が大きく, 流速 0 ml/h でも吸着量が限界値に達していたと考えられる. 流速が 51 ml/h と大きくなると, どちらの濃度においても, 吸着量が減少した (図5, 6). これは, 流速が著しく大きくなると一旦吸着したコラーゲン原線維が流れによって剥離したことによると考えられる.

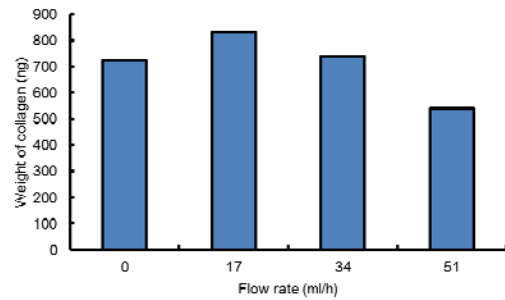


図5 コラーゲン原線維の吸着量 (0.3 mg/ml).

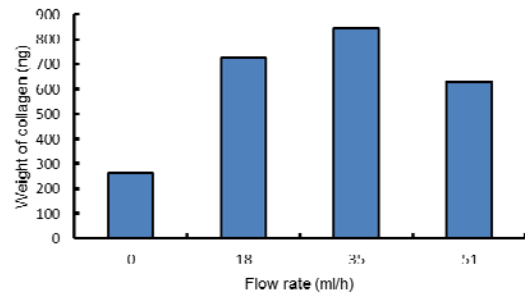


図6 コラーゲン原線維の吸着量 (0.03 mg/ml).

SEM画像を図7~10に示す. 流速 0 ml/h の図7, 9と流速 51 ml/h の図8, 10のどちらにおいても, 原線維は無秩序に吸着しており, 原線維の配向に及ぼす流れの影響は見られなかった. なお, 図8, 10において溶液の流れの方向は左から右である. 濃度 0.3 mg/ml の図7, 8では長さが 50μm を超える原線維が多数観察できたが, 濃度 0.03 mg/ml の図9, 10では長さが 50μm 以上の原線維は観察できなかった. 以上の結果から, コラーゲン原線維の再構成において流れを与えても吸着する原線維の配向に影響は現れなかったが, コラーゲン濃度が高いと長い原線維が多数再構成されることが明らかになった.

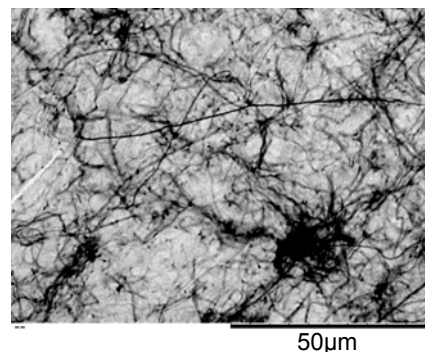


図7 SEM画像 (0.3 mg/ml, 0 ml/h).

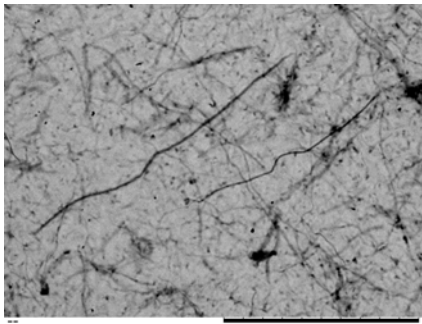


図 8 SEM 画像 (0.3 mg/ml, 51 ml/h).

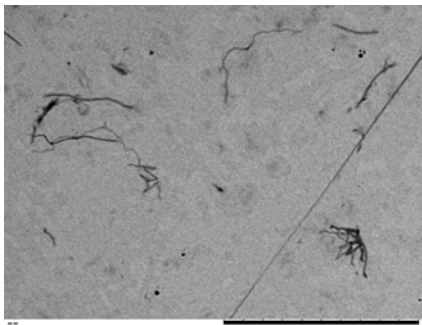


図 9 SEM 画像 (0.03 mg/ml, 0 ml/h).

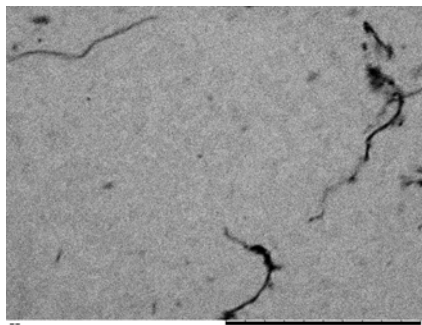


図 10 SEM 画像 (0.03 mg/ml, 51 ml/h).

(3) 再構成コラーゲン原線維の微細構造と力学的性質：自己組織化により再構成された原線維の暗視野画像の一例を図 11 に示す. 長さが 30~250 μm の原線維が数多く観察された. また, 再構成された直径 270nm 程度の原線維を AFM で観察すると表面に 40~70nm の周期を持つ縞模様状の周期構造が見られた (図 12). 生体内にある腱は, 直径 50~500nm で表面に約 67nm の周期構造を持つ原線維で構成されている. このことから, 生体外で再構成された原線維の微細構造は, 腱を構成している原線維の微細構造と同等であることがわかった.

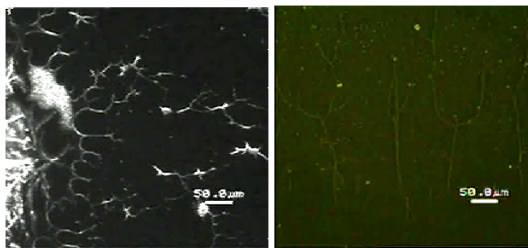


図 11 原線維の暗視野画像.

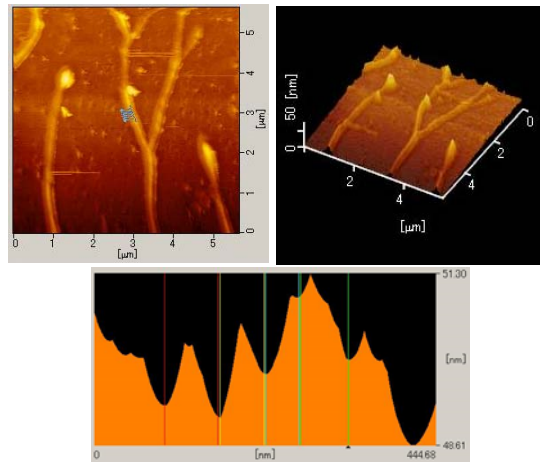


図 12 原線維の AFM 画像.

引張試験に用いた再構成原線維の直径は $367 \pm 24 \text{ nm}$ (Mean \pm S.E.) であった. 得られた応力-ひずみ関係はほぼ線形となった (図 13). 引張強度は $77.9 \pm 28.4 \text{ MPa}$, 破断ひずみは $38.7 \pm 7.6 \%$, 接線弾性係数は $188 \pm 37 \text{ MPa}$ となった. 我々の研究室では, 過去にラット尾腱より摘出した原線維の引張試験を行っている (図 13*). 原線維の直径は $345 \pm 22 \text{ nm}$, 引張強度は $78.7 \pm 12.1 \text{ MPa}$, 破断ひずみは $39.5 \pm 4.4 \%$, 接線弾性係数は $176 \pm 25 \text{ MPa}$ であった. これらの値と本実験で得られた再構成原線維の力学的性質の間に有意差は見られなかった.

以上の結果から, コラーゲン分子が分散したコラーゲン溶液の pH と温度を調節して自己組織化により再構成された原線維は, 生体内の腱を構成している原線維と同等の微細構造と力学的性質を有することが明らかになった.

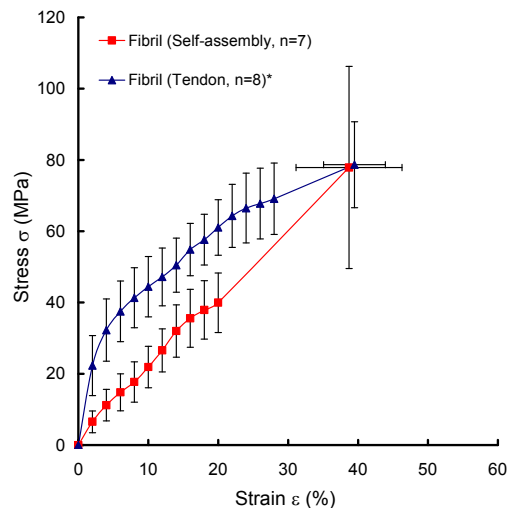


図 13 原線維の応力-ひずみ関係.

(4) 再構成コラーゲン原線維の力学的性質に及ぼすテロペプチドの影響：得られた応力-ひずみ関係を図 14 に示す. I-A と I-P でどちらもほぼ線形となった. I-A に比べて I-P では, 引張強度と接線弾性係数は有意に小さくなり, 破断ひずみは有意に大きくなった. これらの結果から, 両末端にテロペプチドを持つ分子

から再構成された原線維に比べて、テロペプチドを持たない分子から再構成された原線維の力学的強度が小さくなることが明らかになった。我々は、過去にラット尾腱より摘出した原線維の引張試験を行い、力学的性質を求めている。この値と I-A から得られた再構成原線維の力学的性質の間に有意差はみられなかった。

以上の結果から、コラーゲン分子の両末端にあるテロペプチドでの架橋結合が、コラーゲン原線維の力学的性質に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。

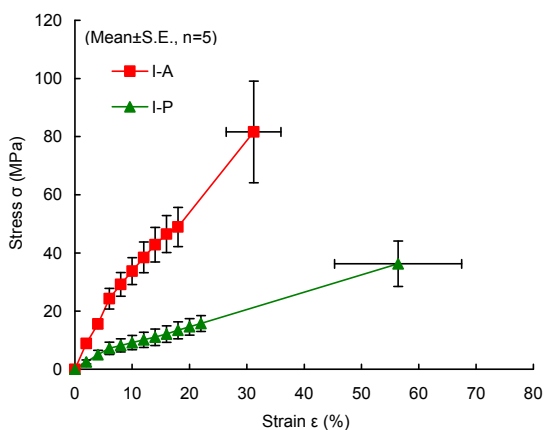


図 14 原線維の応力ひずみ関係。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- ① 山本憲隆, 佐々木健: コラーゲン原線維の再構成に及ぼすコンドロイチン硫酸 B の影響, 日本機械学会論文集, 査読有, Vol.83, No.848, 2017, 1-9, DOI: 10.1299/transjsme.16-00343.
- ② 山本憲隆, 松田侑鷹: 再構成コラーゲン原線維の力学的性質に及ぼすテロペプチドの影響, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 査読無, No.16-76, 2017, 1F31.
- ③ 山本憲隆, 河田耀平: 再構成コラーゲン原線維の微細構造と力学的性質, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 査読無, No.15-69, 2016, 2D22.
- ④ 長坂晃希, 山本憲隆: コラーゲン原線維の再構成に及ぼす溶液流れの影響, 日本機械学会第 26 回バイオフィロンティア講演会講演論文集, 査読無, No.15-40, 2015, 67-68.
- ⑤ 佐々木健, 山本憲隆: 再構成コラーゲン原線維とコンドロイチン硫酸 B の相互作用の解析, 日本機械学会第 25 回バイオフィロンティア講演会講演論文集, 査読無, 2014, 29-30.
- ⑥ Noritaka Yamamoto, Meguru Matsuda: Mechanical Properties of Self-Assembled Collagen Fibrils, Proceedings of the Fourth Japan-Switzerland Workshop on

Biomechanics, 査読有, 2014, 130.

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 山本憲隆, 松田侑鷹: 再構成コラーゲン原線維の力学的性質に及ぼすテロペプチドの影響, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 1 月 19 日, ウィンクあいち (愛知県・名古屋市).
- ② 山本憲隆, 河田耀平: 再構成コラーゲン原線維の微細構造と力学的性質, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016 年 1 月 10 日, 東京工業大学 (東京都・目黒区).
- ③ 長坂晃希, 山本憲隆: コラーゲン原線維の再構成に及ぼす溶液流れの影響, 日本機械学会第 26 回バイオフィロンティア講演会, 2015 年 10 月 2 日, 九州大学 (福岡県・福岡市).
- ④ 佐々木健, 山本憲隆: 再構成コラーゲン原線維とコンドロイチン硫酸 B の相互作用の解析, 日本機械学会第 25 回バイオフィロンティア講演会, 2014 年 10 月 3 日, とりぎん文化会館 (鳥取県・鳥取市).
- ⑤ Noritaka Yamamoto, Meguru Matsuda: Mechanical Properties of Self-Assembled Collagen Fibrils, The Fourth Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, 2014 年 9 月 4 日, 志摩観光ホテル (三重県・志摩市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 憲隆 (YAMAMOTO Noritaka)
立命館大学・理工学部・教授
研究者番号: 40210546