

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 28 日現在

機関番号：82670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500534

研究課題名(和文)不均一径のフィブリルを配向させた人工腱マトリクスの創製とその再構築機序の解明

研究課題名(英文) Fabrication of artificial tendon matrices composed of aligned collagen fibrils with heterogeneous diameters and mechanism of tendon reconstruction in the matrices

研究代表者

柚木 俊二 (Yunoki, Shunji)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部開発第二部バイオ応用技術グループ・主任研究員

研究者番号：20399398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：厚さ3 mmのゲルの全層にわたってコラーゲン線維が一軸配向する、天然の腱の基本構造を模した線維束の作製技術を開発した。高濃度コラーゲン水溶液の線維化速度を加速し、ゲル形成期に限定して剪断応力を付与すると、ゲルの破壊を伴うことなく配向コラーゲン線維束が得られた。線維配向性は線維芽細胞に認識されるに十分であり、線維束は天然腱類似の力学的異方性を示した。ウサギ膝蓋腱に埋植したゲル状の配向コラーゲン線維束は、細胞浸潤性を示さず、6週の間力学特性の変化を生じなかった。本研究により、配向コラーゲン線維束の作製技術が一般化され、細胞浸潤を促す階層構造が人工腱にとって必要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel fabrication method to create a thick collagen bundle with a thickness of 3 mm composed of uniaxially aligned fibrils mimicking the fundamental structure of native tendon. The fabrication method involved shearing of dense collagen sols upon accelerated fibril formation, allowing fabrication of the thick collagen bundle of aligned fibrils (CGAF) without destruction. The aligned collagen fibrils provided mechanical anisotropy similar to that of tendon tissues, which can be recognized by living cells. CGAF implanted into rabbit patellar tendon showed no infiltration of cells, resulted in no change of mechanical properties. The present study generalized a fabrication method of an artificial tendon matrix of which the collagen structure mimicking fundamental structure of native tendon and, furthermore, suggested that an ideal artificial tendon requires a hierarchical collagen structure facilitating cell infiltration.

研究分野：生体材料

キーワード：コラーゲン 人工腱 再構築 配向 せん断

1. 研究開始当初の背景

これまで研究されてきた人工腱・靭帯とは、初期強度のみが高い人工線維束であり、生体内で再構築が起こらないが故に早期の断裂が不可避であった。人工腱から生じる摩耗粉が炎症を生じるといった問題もあった。

そこで、関節外科領域では自家腱移植が多用されている。移植後の自家腱には生体内再構築機転が作用し、物性が経時的に変化し、患者は運動機能を回復することができる。しかし、採取部に与える害が問題になっており、自家腱移植に代わる人工腱マトリクスの開発が待望されている。

しかし、生体内の組織再構築過程を想定に入れた人工腱マトリクスの研究は国内外を問わず全くない。天然の腱マトリクスに起こる再構築現象に関するこれまでの研究は、天然の腱を人為的に改変することで行われてきた。天然の腱マトリクスの構造的特徴を模した人工腱マトリクスを作製し、その構造を制御できれば、*in vivo* 評価により組織再構築現象の核心に迫ることができる。さらに、再構築現象に寄与する構造因子を反映させた、理想的な生体置換型人工腱の開発へと展開できる。

2. 研究の目的

代表研究者が独自に開発してきたコラーゲン線維化と架橋の同時プロセッシングをさらに発展させ、ヒトの腱マトリクスのフィブリル構造を模した世界初の「不均一径のフィブリルで構成される豚由来 I 型コラーゲンを配向させた人工腱マトリクス (CGAF)」を創製し、生体内での組織再構築について評価を行うこと。

3. 研究の方法

(1) CGAF の作製

温度応答性架橋剤であるゲニピンを含有した中性コラーゲン水溶液を、動的粘弾性測定装置の平板センサーで挟みこんだ。回転剪断を与えながら温度を室温から 37°C まで上昇させ、得られた円盤状コラーゲンゲルの円周近傍から CGAF を採取した。

(2) CGAF 作製条件の影響

①コラーゲン水溶液の条件

コラーゲン水溶液の条件として、コラーゲン濃度、NaCl 含有中性リン酸緩衝液 (NPB) 濃度、およびゲニピン濃度を変化させた。

②ゲル化試験

微小振動を用いた動的粘弾性測定もしくは回転による剪断応力測定により、コラーゲン水溶液からの CGAF 形成過程を追跡した。

(3) CGAF の物性評価

①配向度

レーザー光を用いた複屈折測定により、CGAF 中のコラーゲン線維配向度を測定した。

②線維形態

CGAF 中のコラーゲン線維の形状を、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた観察した。

③力学特性

配向軸と平行および垂直方向への引張試験により、CGAF の力学特性を評価した。

④細胞形態への影響

CGAF 上で線維芽細胞を培養し、その配向増殖を評価した。

(4) CGAF の動物実験

架橋度を変えた 2 種類の CGAF と、同様の架橋度で線維配向していない 2 種類のゲル (表 1) を、ウサギ膝蓋腱に埋植した。6 週後に摘出し、組織観察および力学評価を行った。

表 1 動物実験に用いた 4 種類のインプラント

	複屈折位相差から求めた配向性	架橋度※ (アミノ基消費率 (%))
R-L	無秩序	12±1
R-H	無秩序	38±1
A-L	配向	15±3
A-H	配向	36±3

※コラーゲンのアミノ基が分子間架橋に使われ、消費される。消費率が高いことは、密に架橋が導入されていることを示す。

4. 研究成果

(1) 本研究の成果は、生体材料工学に 3 つの進歩を与えた:

①厚さ 1~3 mm のゲルの全層にわたりコラーゲン線維が配向した CGAF の作製に成功したこと

②コラーゲン線維配向に影響する因子を特定し、配向度の制御が可能になったこと

③人工腱マトリクスとしてのポテンシャルを有することを、力学試験および細胞培養によって示したこと

さらに、本研究を通して、細胞浸潤を促す階層構造を人工腱に付与するというビジョンが得られた。

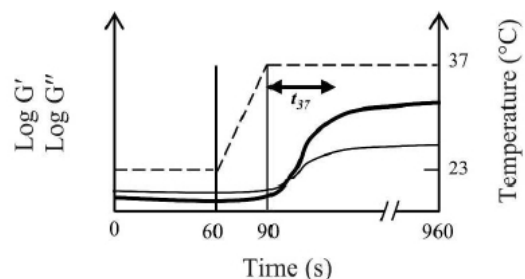


図 1 温度応答性のコラーゲン線維化によるゲル化プロファイルの模式図。

太線が G' を、細線が G'' を示す。ゾルが 37°C に達してからの経過時間を t_{37} と定義した。

(2) 等張液である PBS と類似組成の 1×NPB を濃縮した溶媒を用いると、温度応答性のコラーゲン線維化速度が NPB 濃度依存的に増加することを見出した。コラーゲン線維化に

最適な温度である 37°C に到達直後から線維化が開始される条件を見出し、ゲル形成過程の特定期間 (t_{37}) にのみ回転剪断を付与して、回転剪断の影響を定量的に把握する実験 (図 1) が可能になった。従来の研究に見られるコラーゲン線維化は、37°C に到達してから少なくとも 2 min のタイムラグを生じていた。

(3) コラーゲンゾルに回転剪断を与えながら温度を 37°C に高めても非破壊的にゲルが得られる条件として、コラーゲン濃度 1.8%、NPB 倍数 2.25、ゲニピン (架橋剤) 濃度 2.5 mM を見出し、標準コラーゲンゾルとして用いた。から、回転剪断によりゲルを作製した (図 2a)。ゲルから各種試験片を採取した (図 2b)。厚みは 1~3 mm の範囲で調整可能であった (図 2c は厚み 2 mm ゲルの外観)。

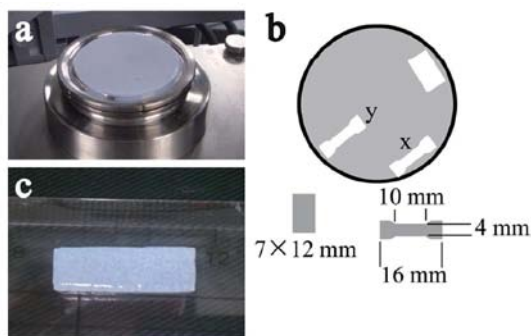


図 2 回転剪断を用いたコラーゲンゲルの作製 (a) 標準コラーゲンゾルの回転剪断により得られた内径 60 mm のコラーゲンゲル、(b) 各種試験片の採取位置、(c) ゲル円周近傍から採取した CGAF (剪断方向すなわち線維配向方向が長軸方向)。

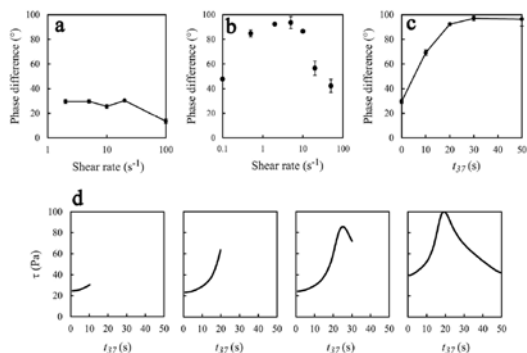


図 3 コラーゲン線維配向に及ぼす回転剪断条件の影響 (a) $t_{37}=0$ での剪断速度の影響、(b) $t_{37}=20$ s での剪断速度の影響、(c) t_{37} の影響、(d) ゲル形成過程での剪断応力の変化

(4) コラーゲン線維の配向度 (複屈折位相差) は、回転条件の影響を受けて変化した。図 3a の結果から、ゲル形成のフェーズに至る直前までの回転剪断 ($t_{37}=0$) は、その剪断速度によらず配向化への影響がほとんど無いことがわかった。一方、 t_{37} を増加させると配向度が飛躍的に増加した (図 3c)。ゲル形成時に

回転を停止する条件では、配向度と剪断速度の関係は凸型となり、剪断速度が高すぎても低すぎても配向度が低下することが明らかになった (図 3b)。ゲル形成時の剪断応力をモニターすると、配向度が極大に達した後に、ゲルの硬化にともないセンサーが滑りだして応力が低下する様子が観察された (図 3d)。

(5) 複屈折位相差が最も高くなる条件で作製したコラーゲンゲルの線維配向を図 4a に示す。剪断を付与しない条件で作製した無秩序な線維ネットワーク (図 4b) と比較して、剪断方向 (写真の水平方向) と平行な線維配向が明瞭に観察された。ギャップを 3 mm まで拡大しても、全層に渡って配向が達成された。

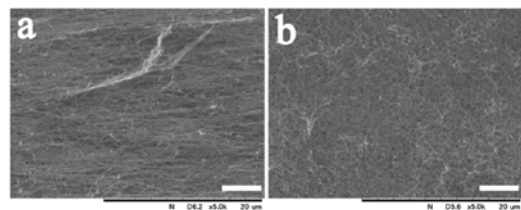


図 4 CGAF (回転剪断により作製したコラーゲンゲル) (a) および微小振動で作製したコラーゲンゲル (b) の内部の線維構造の SEM 像

(6) センサーのギャップを 3 mm に拡大し、 t_{37} を変化させてゲルを作製して断面のコラーゲン線維構造を観察した結果、線維の配向化は加温される下部プレート側から回転する上部プレートまで逐次進行することが明らかになった。ゲル形成過程 ($G \gg G'$) での層流形成は起こり得ないことから、剪断によるコラーゲン線維配向化に関するこれまでの研究で示唆されていた 'コラーゲン分子の流体力学的な配向による線維形成への移行' ではなく、絡み合ったコラーゲン線維の '引張り' により配向化が進行するメカニズムが考えられた。

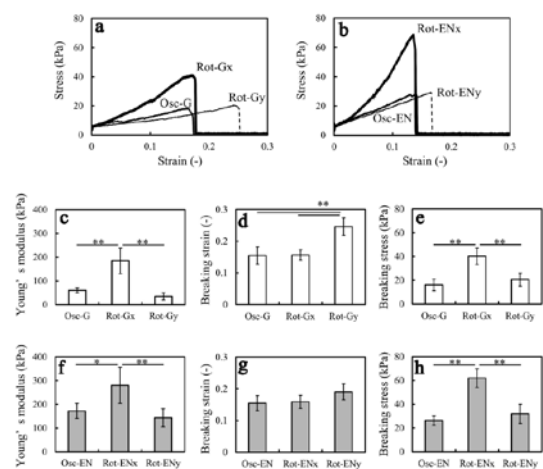


図 5 コラーゲンゲルの引張試験結果 (a) 回転剪断で作製したコラーゲンゲル (Rot-G) および微小振動で作製したコラーゲンゲル (Osc-G) の代表的な応力 - 歪曲線。

サンプル名に付記した x および y は、図 2b に示したサンプル採取方向に対応している。(b) EDC/NHS 架橋により強化した Rot-G および Osc-G (それぞれ、Rot-EN および Osc-EN) の強化した代表的な応力 - 歪曲線。(c), (d), および(e)は、それぞれ Rot-G ならびに Osc-G の応力 - 歪曲線から算出したヤング率、破断歪、および破断応力である。(f), (g), および(h) は、それぞれ Rot-EN ならびに Osc-EN の応力 - 歪曲線から算出したヤング率、破断歪、および破断応力である。

(7) 天然の腱に見られるように、得られた CGAF は配向化により力学特性に異方性を示した (図 5)。無秩序なコラーゲン線維ゲルに比べ、CGAF は配向軸に平行な引張に対して高い弾性率と破断強度を示した。この異方性は、化学架橋によって強度を高めた試料についても維持された。

(8) CGAF 上で線維芽細胞を培養すると、線維配向軸に沿って仮足および細胞形態が伸展し (図 6a および 6c)、CGAF の配向度が生体内で細胞に認識されることが示唆された。このような現象は、無秩序な線維では認められなかった (図 6b および 6d)。コラーゲン線維ネットワークが緻密であり、CGAF には細胞の浸潤性が無いことも示唆された。

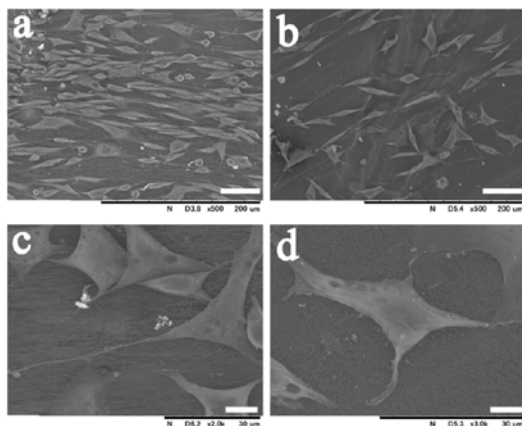


図 6 回転剪断で作製したコラーゲンゲル (Rot-G) 上(a および c)ならびに微小振動で作製したコラーゲンゲル (Osc-G) 上 (b および d) で培養した線維芽細胞の SEM 像. 図中の白線は 10 μm を示す.

(9) ウサギ膝蓋腱に作製したスリット状の欠損に対して図 7 に示すように埋植した表 1 のゲル状インプラント (2×3×20 mm³) のうち、高架橋 (A-H および R-H) のインプラント周囲の組織観察像を図 8 および図 9 に示す。6 週後でもインプラントが残存していることが、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色から確認された。生体組織とインプラントの界面には細胞の集積が認められたが、インプラント内部への細胞浸潤およびトルイジンブルー (TB) 染色される酸性多糖類の生成はインプ

ラント内部において認められず、腱のリモデリングが生じなかったことがわかった。この結果は、コラーゲン線維の配向および無秩序によらず同じであった。細胞培養試験の結果 (図 6) から予想されるように、外来性の細胞がインプラント内部に浸潤できるような空隙が無いために細胞浸潤が生じなかったと考えられた。

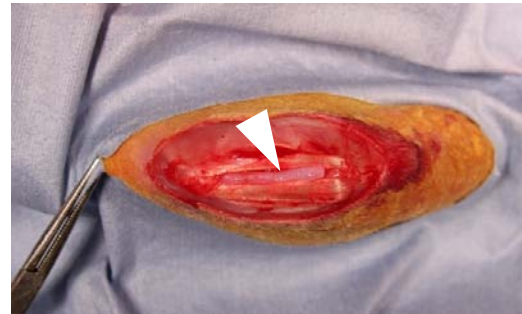


図 7 ゲル状インプラント (図中の矢印) をウサギ膝蓋腱欠損部に埋植した様子

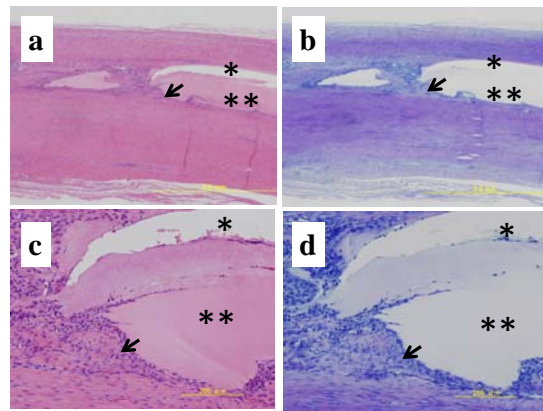


図 8 ウサギ膝蓋腱に埋植したインプラント A-H およびその周囲の組織の HE 染色像(a) および TB 染色像(b). (c) および(d) は、それぞれ (a) および(b) の拡大である. *, 空隙; **, インプラント; 矢印, 界面に集積した細胞.

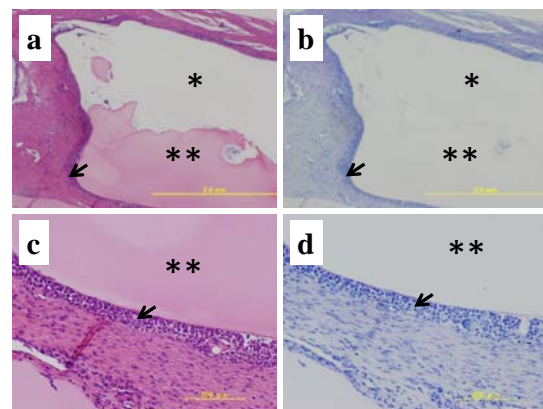


図 9 ウサギ膝蓋腱に埋植したインプラント R-H およびその周囲の組織の HE 染色像(a) および TB 染色像(b). (c) および(d) は、それぞれ (a) および(b) の拡大である. 記号の意味は図 8 と同様.

高架橋のインプラントが埋植 6 週後も残存していたのに対し、低架橋インプラント (R-L および A-L) は完全に吸収されていた。生体内で酵素消化に対する耐性が低かったためと考えられた。人工腱の作製にとって、架橋度による生体吸収性の制御が重要であることが示唆された。

(10) ウサギ膝蓋腱から摘出したインプラント A-H および R-H に対して前出の引張試験を実施した結果 (A-H については配向軸方向のみ) を図 10 に示す。摘出時にインプラントが壊れやすく、n=2 での実施となったが、6 週の埋植期間を経ても力学特性の変化がほとんど見られなかった。リモデリングが生じなかったとする組織観察の結果と整合した。

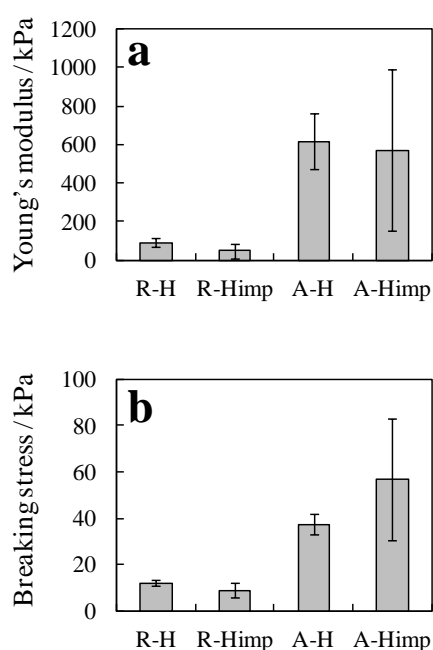


図 10 ウサギ膝蓋腱に埋植したインプラント R-H および A-H の引張試験から得られたヤング率(a)および破断応力(b)比較として移植前のインプラントも試験した。横軸のサンプル名称の imp は 6 週埋植後を示す。

<結論>

ヒトの腱マトリクスの基本構造を模した世界初の「不均一径のフィブリルで構成される豚由来 I 型コラーゲンを配向させた人工腱マトリクス (CGAF) の創製に成功した。その配向化メカニズムの詳細を明らかにして、製造技術として一般化した。その配向構造は細胞に認識されたが、細胞浸潤性が無いためウサギ膝蓋腱内でリモデリングを受けなかった。CGAF はゲル状態で得られるため、緻密化や多孔質化が容易であるという利点がある。この利点を活かして、今後は、天然の腱が持つコラーゲン階層化構造を模倣した腱マトリクスの開発とその組織再構築機序の解明へと進む予定である。

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)

Yunoki S, Hatayama H, Ebisawa M, Kondo E, Yasuda K. A novel fabrication method to create a thick collagen bundle composed of uniaxially aligned fibrils: An essential technology for the development of artificial tendon/ligament matrices. *J Biomed Mater Res A*. 2015 published online 査読有

Yunoki S, Ohyaabu Y, Hatayama H. Temperature-responsive gelation of type I collagen solutions involving fibril formation and genipin crosslinking as a potential injectable hydrogel. *Int J Biomater*. 2013 article ID. 620765. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Yunoki S, Ohyaabu Y, Hatayama H. Temperature-responsive Gelation of Type I Collagen Solution Containing Genipin that Keeps Fluidity at Room Temperature. The 9th International Polymer Conference 2012 神戸国際会議場 (神戸), ポスター

[図書] (計 1 件)

柚木俊二、大藪淑美 「コラーゲン改質技術による細胞培養基板の構築」 <最新>動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術 技術情報協会 2014:90-95

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: コラーゲングルの作製方法及びコラーゲングル

発明者: 柚木俊二、畑山博哉、海老澤瑞枝、近藤英司、安田和則

権利者: 東京都立産業技術研究センター

種類: 特許

番号: 特願 2014-210060

出願年月日: 平成 26 年 10 月 14 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

柚木俊二 (東京都立産業技術研究センター)

研究者番号: 20399398

(2)研究分担者

安田和則（北海道大学大学院 医学研究科）

研究者番号：20166507

近藤英司（北海道大学大学院 医学研究科）

研究者番号：60374724

畑山博哉（東京都立産業技術研究センター）

研究者番号：80614552

(3)連携研究者

なし