

平成21年4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18592173

研究課題名（和文） 機能性ヒトリコンビナントミニコラーゲン開発の基礎的研究

研究課題名（英文） Testing the utility of rationally engineered human recombinant collagen-like proteins for applications 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：ミニコラーゲンcDNAを設計し、哺乳動物細胞に遺伝子導入、得られた蛋白は温度安定性もあり、蛋白を培養フラスコに塗布し、培養軟骨細胞、骨芽細胞様細胞を培養すると増殖能が優位に増加した。培養軟骨細胞をMicromass culture法にて軟骨塊を形成させると、塗布したフラスコで培養した細胞は、軟骨塊の直径が約2倍となった。蛋白の凍結乾燥で黄白色の線維状ミニコラーゲンが得られ、h-BMPのDDSとして使用すると、異所性骨化が確認された。機能性ヒトリコンビナントミニコラーゲンは再生医療のスキヤフォールドとして有用であることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	900,000	0	900,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	630,000	3,630,000

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：口腔外科学一般(含病態検査学)

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは生体を構成する重要な成分であり、多彩な働きを司っており、疾患との関係においても重要な役割を担っている。現在までコラーゲンはその生体親和性から、いろいろな医用材料に各種動物から抽出されているが、昨今の狂牛病の発生以来、現在ではその安全性が疑問視されている。また、臓器移植を念頭においたヒト遺伝子、ヒト染色体を組みこんだ動物本体を用いたヒト臓器工場も

その安全性は不明である。

人工臓器開発における現在までの問題点としては、その拒絶反応つまり、生体親和性、安全性であり、これまでの一時的な物理的な機能のみでなく、生物学的な機能も代行する人工臓器の開発が求められている。そのためには、細胞とマトリックスを組み込んだ人工臓器が必要とされており、細胞の足場であるマトリックス材料、スキヤフォールド材料の開発は急務である。コラーゲンはこのマトリ

ックス材料, スキャフォールド材料候補としては最適であるが, 現在の動物コラーゲンよりも安全で, 新しい機能を持ったコラーゲンの開発が必要である.

申請者らは, 以前より人工臓器マトリックス材料, 骨・軟骨再生のための生体親和性の高い, ヒト由来スキャフォールド作製を視野に, ヒト遺伝子, ヒト細胞を用いたリコンビナントコラーゲン作製システムの基礎研究を行ってきた. 本研究において利用されるリコンビナントプロコラーゲン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, 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. Prockop, Dr. Fertala と共同研究を施行している. われわれは, 本申請研究が軌道に乗れば, 新しい効率のよい高発現システムを開発し, 商品化, 産業化を目指し, 産学連携研究を遂行したいと考える.

この研究は, タイプ I プロコラーゲンの 8 つに分けられた ドメイン; signal peptide, N-propeptidetelo peptide, D1, D2, D3, D4, D4. 4, C-propeptidetelo peptide をコードする一連の cDNA カセットを PCR 反応を利用して作製するシステムを確立した. このシステムにより, ヒトタイプ I プロコラーゲンのアミノ酸配列を変化させることなく設計, cDNA において特定の三重らせん部位 (D 周期: D1, D2, D3, D4, D4.4) を欠損させ, 数種類の D 周期欠損変異型タイプ I プロコラーゲン cDNA を作製, ヒト由来哺乳動物細胞に遺伝子導入, リコンビナント蛋白を作製, 精製してきた. そのリコンビナント蛋白の解析の結果, コラーゲンの三重らせん構造に必須のドメイン, フィブロネクチンと親和性の非常に高いドメインを含む部位が明らかとなった.

2. 研究の目的

本研究においては, コラーゲン利用研究の過程で, 天然のコラーゲンよりもっと都合のよい改良型コラーゲン分子を設計し, 作製していくことが期待される. 人間の望む性質や性能を持つタンパク分子を自由自在に設計し, コラーゲンについては, 自由に架橋を作らせたり, 切り離

したりすることのできる分子が一つの目標となる. また, コラーゲン分子が特定の分子と強い結合力を持つコラーゲンを設計させることが可能となれば, その応用は計り知れない. 本研究の cDNA カセットシステムでは, ヒトタイプ I プロコラーゲン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. 本申請研究は,

I. 新規機能性 ヒト リコンビナントミニタイプ I プロコラーゲン蛋白 cDNA を設計.

II. ヒト由来哺乳動物細胞に遺伝子導入, 新規機能性 ヒト リコンビナントミニコラーゲン蛋白を作製, 精製.

III. 培養軟骨細胞, 培養骨芽細胞様細胞のスキャフォールドとして, 細胞親和性の検討.

IV. 培養骨芽細胞様細胞+スキャフォールド複合体をマウス大腿筋膜下に移植し, 異所性骨形成の検討を行い, 新規機能性ヒトリコンビナントミニコラーゲン蛋白のスキャフォールドとしての可能性について検討することである.

3. 研究の方法

(1) 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 カセットの作製, 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) を欠損させた新規のリコンビナントタイプ I プロコラーゲンホモトライマー cDNA (ミニリコンビナントタイプ I プロコラーゲン cDNA) を作製する.

① N-telpro, D1, D4.4, C-telpro,

② N-telpro, D1, D4, D4.4, C-telpro,

③ N-telpro, D1, D4, D4, D4.4C-telpro,

④ N-telpro, D1, D4, D4, D4, D4.4, C-telpro
telpro: telo peptidepro peptide

作製した D2, D3 欠損タイプ I プロコラーゲン 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. これら蛋白の生化学解析, 構造解析を行い, 化学修飾の必要性 (テロペ

チドの消化など)を検討する。また、①～④のそれぞれについて、温度安定性、三重らせん構造について精査する。

(2)精製し、化学修飾されたミニコンビナントタイプ I プロコラーゲンをスキャフォールドとして培養軟骨細胞、培養骨芽細胞様細胞を培養し、細胞の親和性、増殖能を検討する。

(3)精製し、化学修飾されたミニコンビナントタイプ I プロコラーゲンをスキャフォールドとして培養軟骨細胞、培養骨芽細胞様細胞を培養し、ヌードマウス大腿筋膜下に移植、異所性骨化組織誘導し、X線学的検討、組織学的検討を行う

4. 研究成果

新規のミニコンビナントタイプ I プロコラーゲン cDNA,

①N-telpro, D1, D4, 4, C-telpro,

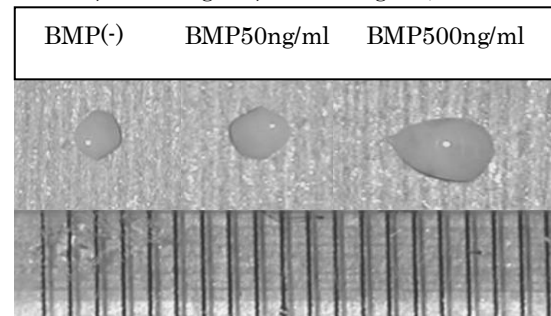
②N-telpro, D1, D4, D4, 4, C-telpro,

③N-telpro, D1, D4, D4, D4, 4C-telpro,

④N-telpro, D1, D4, D4, D4, D4, 4, C-telpro
telpro: telopeptidepropeptide

をHT1080細胞、SW-1353細胞に遺伝子導入、遺伝子強制発現させた。スクリーニングで選択された、強発現細胞の培養上清からリコンビナント蛋白を回収、アミノ酸シーケンスを行い、蛋白の温度安定性の生化学的解析構造解析を行った。その結果、③と④のcDNAカセットが最も温度安定性があり、三重らせん形成の安定度も良好であることが証明された。C末端プロペチドの切断酵素についてはコンドロイチナーゼABC、トリプシン、カイモトリプシン、C-proteinase、N-proteinaseについて検討し、C-proteinase、N-proteinaseが最も良好な結果であった。テロペプチド消化は、ペプシンにて行い、弱酸性溶液として、培養フラスコに塗布して、骨芽細胞様細胞として、MC3T3-E1、軟骨芽細胞様細胞としてATDC5の細胞増殖能について検討した。その結果、③と④のミニコラーゲンにおいて、MC3T3-E1については細胞増殖能が約2倍に、ATDC5については、細胞増殖能は約1.6倍上昇が認められた。また、ウサギ、ヒト顎関節滑膜由来未分化間葉系細胞を③と④のミニコラーゲンを塗布した培養フラスコ、塗布していない培養フラスコで培養、次にmicromass culture法にて軟骨塊を形成させると、軟骨塊は2倍以上の直径となることから、明らかとなった。同様に、medium内にbone morphogenetic protein(BMP)を添加させると、写真のよう

に軟骨塊はBMP500ng/mlでは約4倍となった(右上部写真は、左からmediumにBMP添加なし、BMP50ng/ml, BMP500ng/ml)。



③と④のミニコラーゲンの凍結乾燥を行い処理時間が24時間では黄白色の線維状ミニコラーゲンを、48時間以上行くと線維状からパウダー状へと容易に崩壊した。下図は黄白色の線維状ミニコラーゲン。



黄白色の線維状ミニコラーゲンを走査型電子顕微鏡にて観察すると、コラーゲン細線維が絡み合い、一部線維は崩壊し、塊構造が観察された。

ヒトリコンビナントbone morphogenetic protein(BMP)のドラッグデリバリーシステム(DDS)として、黄白色の線維状ミニコラーゲンとパウダー状ミニコラーゲンを使用、ポジティブDDSコントロールとしてゼラチンカプセル、ネガティブコントロールとしてゼラチンカプセルのみを使用した。ヌードマウス大腿筋膜下へそれぞれ移植したところ、術後2週間で、BMP5 μ g+黄白色の線維状ミニコラーゲン、BMP5 μ g+パウダー状ミニコラーゲン、BMP5 μ g+ゼラチンカプセルで異所性骨化が確認された。

骨形成量はBMP5 μ g+黄白色の線維状ミニコラーゲン、BMP5 μ g+パウダー状ミニコラーゲンがともに良好であったが、パウダー状ミニコラーゲンでは骨が分散する傾向が認められた。

下写真はBMP5 μ g+黄白色の線維状ミニコラーゲンによる異所性骨化の軟X線写真で

ある。マウス大腿骨と比較して、X線学的に遜色のない骨組織が得られた。



今回作製した機能性ヒトリコンビナントミニコラーゲンは再生医療のスキヤフォールドとして有用であることが示された。

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)

①杉江泰仁, 服部 宇, 浜村和紀, 篠田雅路, 水谷英樹, 上田 実

Sonic Hedgehog cDNA-plasmid Vector Transduction by Microbubble-Enhanced Sonoporation for Ectopic Bone Formation.

International Journal of Oral-Medical Sciences Vol.7 77-86, 2008 査読有

②服部 宇, 上田 実

関節軟骨の再生 (顎関節)

The BONE Vol.21 81-85, 2007 査読無

[学会発表] (計 4件)

①杉山昌彦, 服部 宇, 上田 実, 中島美砂子

歯髄由来 CD31-SP 細胞の神経再生に対する有効性の検討

第 53 回日本口腔外科学会総会

10. 20. 2008 徳島

②杉山昌彦, 庵原耕一郎, 脇田英明, 服部 宇, 上田 実, 中島美砂子

歯髄 CD31 陰性 SP 細胞の歯髄および脳組織における神経・血管再生に対する効果の検討

日本歯科保存学会 2008 6. 5. 2008 新潟

③服部 宇, 西口浩明, 小田知生, 廣中克紀, 上田 実

機能性ヒトリコンビナントミニコラーゲン開発の基礎的研究

第 52 回日本口腔外科学会総会

9. 29. 2007 名古屋

④服部 宇, 水谷英樹, 安江一紀, 遠藤泰昭, 中田茂樹, 峰野泰久, 田口望, 上田 実

ヒト顎関節滑膜組織由来幹細胞の軟骨形成に関する基礎的研究.

第 20 回日本顎関節学会総会

7. 14. 2007 仙台

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

小田 知生 (ODA TOMOO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10378002

山田 陽一 (YAMADA YOICHI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20345903

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