様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 ２２ 日現在

機関番号：１０１０１
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2021～2024
課題番号：２１Ｈ０４７３１

研究課題名（和文）魚類コラーゲンの医療利用：骨インプラント表面への骨ミメティックコート技術の開発

研究課題名（英文）Biomedical application of fish collagen: Development of the bone-mimetic collagen-fibril coating on the titan-made bone implant

研究代表者

都木　靖彰（TAKAGI, Yasuaki）

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：１０２１２００２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　34,080,000円

研究成果の概要（和文）：我々のグループが発見したチョウザメ浮袋コラーゲンの高い線維形成能を利用し，生体骨様の高配向性コラーゲン原線維に生体骨を模倣した方法でリン酸Caヒドロキシアパタイト結晶を沈着させることで，真に生体骨の構造を模倣した「骨ミメティック材料」を創出した。次に，人工関節等のインプラントに用いられるチタン合金表面に骨ミメティック構造を付与する新規技術を開発した。最後に，非石灰化高配向性コラーゲン原線維が間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を効率的に誘導することを証明した。今後，骨ミメティック構造に対する細胞反応性をさらに詳しく調べるとともに，実験動物を用いた移植試験が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本成果の学術的意義は，非石灰化高配向性コラーゲン原線維が間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化の初期（分化運命決定）および中期を強く促進することを証明した点にある。このことは，細胞足場材料のコラーゲン原線維の形態（太さや配向性）が幹細胞の分化に強く影響することを示している。また，真に生体骨の構造を模倣した「骨ミメティック材料」の創出と，これをチタン合金にコートする骨ミメティックコート技術の開発の成功は，将来の人工骨やインプラント表面改質技術への発展が期待できるため，社会的意義が高い。

研究成果の概要（英文）：Leveraging the high fibrillogenesis potential of sturgeon swim bladder-derived collagen, as identified by our research group, we successfully fabricated a bone-mimetic material that replicates the hierarchical structure of natural bone, depositing hydroxyapatite crystals into highly oriented collagen fibrils using a biomimetic mineralization approach. Subsequently, we developed a novel technique for imparting this bone-mimetic architecture onto the surface of titanium alloys commonly employed in orthopedic implants such as artificial joints. Furthermore, we demonstrated that non-mineralized, highly oriented collagen fibrils effectively promote the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Future work will involve a more detailed investigation of cellular responses to the bone-mimetic architecture and transplantation studies using animal models to evaluate in vivo performance.

研究分野：魚類硬組織生理学

キーワード：コラーゲン原線維コーティング　再生医療チタン材料　表面加工　骨誘導　水産廃棄物利用

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

水産副生物に多量に含まれる海洋性コラーゲンの産業利用は我が国でも進んでいるものの，その大部分は価格の観点から輸入原料由来であり，当初目標である国産の水産副生物の有効活用にはつながっていない。一方で，我が国は他国と比較して高度に衛生的な水産物取り扱い技術を持つため，厳密な衛生管理のもとで生産された水産副生物から清浄なコラーゲンを生産することが可能である。本研究課題の最終目標は，この特長を活かし，最も高付加価値なコラーゲンの利用法として医療利用を実現し，国内水産業の発展と SDGs 達成の一助とすることである。

組織を人工的に構築する組織工学やそれを利用した再生医療では，細胞を効率的に目的組織と同様に構築し得る人工的な細胞足場の開発競争がおこなわれている。生体内組織の細胞足場であるコラーゲンは，人工細胞足場材料の理想的な原料である。たとえば骨再生分野では，幹細胞の集合と骨芽細胞への分化を効率的に誘導し（骨誘導），新たな骨形成を誘起し得る人工的な細胞足場として，生体骨の主要成分であるコラーゲンやリン酸カルシウムのヒドロキシアパタイト結晶（HA 結晶）を用いた「人工骨」の開発が進められてきた。また，歯，人工関節，治癒不全を起こした骨折の治療等に移植される体内埋め込み器具（インプラント，多くはチタン合金製）は，その周辺で誘起される骨誘導によりインプラント表面で骨形成が起こり，周囲の骨と融合して（骨伝導）強固に固定される。このため，インプラント表面に骨誘導能を付与する目的で，生体骨成分であるコラーゲンや HA 結晶の薄層をコートする試みがなされてきた。しかし，現在の人工骨やインプラント表面コート技術は，特にその力学特性（強度など）が劣り，周辺の骨との力学的なミスマッチが起こって骨伝導不全が起こることに大きな問題を抱えている。生体骨の強靱な構造は「一方向に配向したコラーゲン線維がその配向方向を変えて何層も重なり合い，それに HA 結晶が沈着する」ことで造り出される。既存の技術の機能が劣る理由は，コラーゲンと HA 結晶のハイブリッド材料は合成できるものの，これまで研究に用いられてきた哺乳類（ブタ，ウシ）由来コラーゲンでは線維形成能が低く，一方向に配向したコラーゲン線維を造り出せないことにあった。

２．研究の目的

我々のグループはチョウザメの浮袋コラーゲンが高い線維形成能を持ち，生体骨様の高配向性コラーゲン線維からなる材料を創り出せることを示した [1]。そこで，これを生体骨を模倣した方法で石灰化させれば，真に生体骨の構造を模倣した石灰化高配向性コラーゲン線維（骨ミメティック構造）が形成され，高強度かつ高骨誘導能を持つ材料を創出できると考えた。本研究課題では，その核心をなす学術的「問い」を『魚類コラーゲンが創り出す骨ミメティック構造に対し，細胞はどのように反応するか（骨芽細胞への分化や骨芽細胞機能は活性化されるか）』におき，魚類コラーゲンのみが作り得る「高配向性コラーゲン線維コート」技術を，「骨ミメティックコート技術」へと発展させてインプラント表面へのコート技術を開発するとともに，骨ミメティック構造に対する細胞の反応性を明らかにすることで，従来研究では未踏であった「魚類コラーゲンの医療利用の実現」に向けた第一歩とする。

３．研究の方法

我々の研究グループが開発した方法 [2] に従い，ベステルチョウザメの浮袋から I 型アテロコラーゲンを抽出した。次に，同様に我々の研究グループが開発した方法 [1] を改良して作成したコラーゲン原線維コートを，polymer-induced liquid-precursor (PILP) 法を用いて石灰化させた。PILP 法は，石灰化溶液に負に荷電した酸性ポリマーを添加することで溶液中の Ca イオンを引きつけて結晶化を阻害し，非晶質相を形成させるとともにそれを保持させ，原線維内への Ca，P の浸透を促すことで，生体骨に認められる原線維内部のコラーゲン分子間への HA 沈着を誘起することができる手法である [3]。これは，生体骨で起こる HA 沈着を再現する手法である。

４．研究成果

(1) 骨ミメティック構造の創出

石灰化溶液中の Ca，P 濃度を調節することにより，コラーゲン原線維コートをほぼ均一に石

灰化することに成功した（図 1）。石灰化処理後にはコラーゲン原線維の配向性には変化は生じず，原線維が太くなり（石灰化処理前：線維径平均 124.19 nm，分布範囲 61～244 nm，石灰化処理後：線維径平均 285.41 nm，分布範囲 135～478 nm），EDS により検出される Ca，P 沈着量が大きく上昇した。加えて，XRD 解析では HA 固有ピークを検出した。また，クライオセクションポリッシャにより試料断面を作成し，EDS マッピング解析によりコート内部の原線維まで Ca が沈着していることを証明するとともに，原線維内部の石灰化が進行した可能性を示唆した。以上の結果から，当初期待していた通りの骨ミメティック構造を持つコーティング技術の創出に成功したと判断した。

次に，創出した骨ミメティック構造の強度測定をおこなった（図 2）。しかしながら，試料による測定値のばらつきが大きく，定量的な結論には至っていない。

さらに，骨ミメティック材料の応用範囲を拡大する目的で，線維状およびディスク状のコラーゲン原線維試料を作製し，これまでの成果で確立した PILP 法により石灰化をおこなった。作製した骨ミメティック材料の石灰化特性を SEM，EDS，ラマン分光顕微鏡，熱重量分析によって評価したところ，いずれの試料でも HA 結晶の析出を確認できた。石灰化コラーゲン原線維径は，線維状試料で 0.14±0.04 μm，ディスク状試料で 0.23±0.06 μmであった。また，熱重量分析によるコラーゲンの重量割合は線維状試料で 53%，円盤状試料で 75%であった。試料形状により構造的な差は見られたものの，いずれも骨ミメティック材料の創製に成功したと結論した。

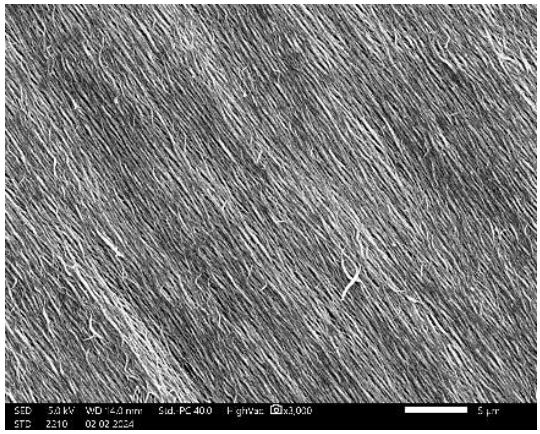

図 1 石灰化コラーゲン原線維（骨ミメティック構造）

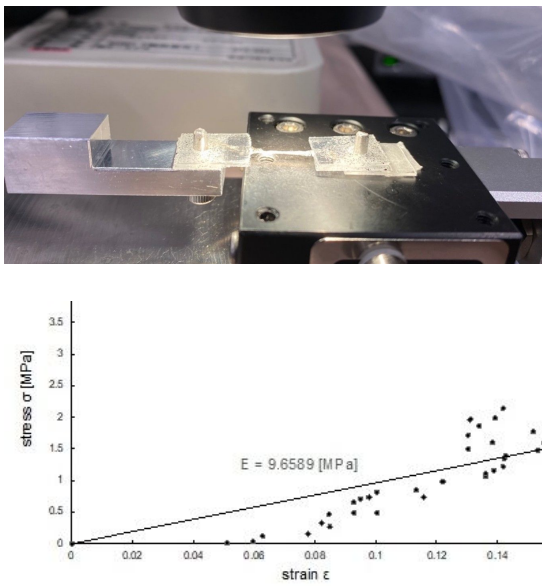

図 2 骨ミメティック構造の強度測定の様子（上）と測定された Stress-Strain カーブ

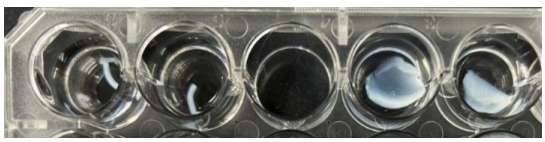

図 3 線維状およびディスク状の骨ミメティック材料

(2) チタン材料表面への骨ミメティックコート技術の開発

本課題では，人工関節等のインプラントに用いられるチタン合金表面に骨ミメティック構造を付与する新規技術「骨ミメティックコート技術」の開発に成功した。インプラント表面に骨誘導能を付与する目的で先行研究においてコートされてきたのは，生体骨の無機成分もしくは有機成分のどちらか一方であったため，その独自性と創造性は極めて高い。

(3) 骨ミメティック構造に対する細胞反応性の解明

上述した骨ミメティック材料および骨ミメティックコートの創出に成功するまでの期間で，石灰化していないコラーゲン原線維コートを用い，これがヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の骨芽細胞分化に及ぼす影響を調べた。まず hMSC から骨芽細胞への分化運命決定の際に発現する転写因子である RUNX2 の発現は，非石灰化原線維コート上の細胞で 1, 3 日目に顕著に促進された。また骨芽細胞のマーカー酵素である ALP 活性は培養 7 日目に有意に高かった。すなわち，非石灰化原線維コート上では hMSC は培養直後に骨芽細胞への分化を開始し，培養 7 日目には前骨芽細胞から骨芽細胞への分化（骨芽細胞分化の中期）の過程に達することを明らかにした。このように非石灰化原線維コートは骨誘導を初期から促進する能力を持つことが示された。

次に，骨ミメティックコート（実験上，コートは細胞培養用プラスチック製カバースリップに施した）上でマウス前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 を培養し，非石灰化コラーゲン原線維コートで培養したものと細胞形態を比較したところ，非石灰化原線維コート上の細胞は扁平な形をとるのに対し，骨ミメティックコート上の細胞は，播種後 3 時間から 6 時間にかけて扁平な形から細長い形に変化した。このことから，コラーゲン原線維の石灰化が何らかの形で MC3T3-E1 細胞に影響を与えることが分かる。現在，前骨芽細胞から骨芽細胞への分化（骨芽細胞分化の中

期）活性を調べるための ALP 試験を遂行中である。

(4) まとめ

以上のように，4 年間の研究推進により，当初計画の 3 つの小課題 (1) 骨ミメティック構造の創出，(2) チタン材料表面への骨ミメティックコート技術の開発，(3) 骨ミメティック構造に対する幹細胞反応性の解明，に関しておおむねその目標を達成し，インプラント（多くはチタン合金製）表面に骨誘導能を付与する可能性がある骨ミメティックコートの開発に成功したと結論した。加えて，線維状，ディスク状に加工したコラーゲン原線維材料の石灰化にも成功し，3 次元構造を持つ骨ミメティック材料の創出にも成功した。今後，骨ミメティック材料に対する細胞反応性をさらに詳細に調べるとともに，骨ミメティックコートを施したチタン合金材料を用いた実験動物レベルの移植実験が必要になる。本課題で得られた成果は，魚類コラーゲンの原線維形成に関する研究実績を持つ北海道・大学院大学水産科学研究院と，コラーゲン石灰化機構研究に関する材料科学的研究実績を持つ同・大学院工学研究院の異分野連携による大きな成果である。

引用文献

[1] Moroi et al., 2019, https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109925
[2] Zhang et al., 2014, http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.075
[3] Olszta et al., 2007, https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計7件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 西山ゆうか，柿澤俊壱，東藤 正浩，都木靖彰
２．発表標題 骨模倣石灰化コラーゲンマトリックスの構造的および力学的特性
３．学会等名 日本機械学会2024年度年次大会
４．発表年 2024年

１．発表者名 柿澤俊壱，東藤正浩，都木靖彰
２．発表標題 魚類コラーゲンコーティングに及ぼすハイドロキシアパタイト中間層の影響
３．学会等名 第63回日本生体医工学会北海道支部大会
４．発表年 2024年

１．発表者名 Shunichi Kakizawa, Yasuaki Takagi, Masahiro Todoh
２．発表標題 Fish collagen-based bone-mimetic coating for biomedical applications
３．学会等名 18th International Conference on Biomedical Engineering
４．発表年 2024年

１．発表者名 生末学・東藤正浩・浦和寛・都木靖彰
２．発表標題 石灰化コラーゲン原線維の細胞培養ウェルへのコーティング技術の開発
３．学会等名 令和5年度日本水産学会秋季大会
４．発表年 2023年

１．発表者名
東藤正浩，西山ゆうか，柿澤俊壱，都木靖彰

２．発表標題
骨模倣材料を目指したコラーゲン膜生成に及ぼす基材の影響

３．学会等名
第50回日日本臨床バイオメカニクス学会

４．発表年
2023年

１．発表者名
東藤正浩，柿澤俊壱，西山ゆうか，都木靖彰

２．発表標題
魚類コラーゲンコーティングに及ぼすハイドロキシアパタイト中間層の影響

３．学会等名
第62回日本生体医工学会北海道支部大会

４．発表年
2023年

１．発表者名
生末学，東藤正弘，浦和寛，都木靖彰

２．発表標題
石灰化コラーゲン原線維の細胞培養ウェルへのコーティング技術の開発

３．学会等名
第44回日本バイオマテリアル学会大会

４．発表年
2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	浦　和寛 (URA Kazuhiro) (90360940)	北海道大学・水産科学研究院・准教授 (10101)	

６．研究組織（つづき）

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	東藤　正浩 (TODOH Masahiro) (10314402)	北海道大学・工学研究院・教授 (10101)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関