

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12675

研究課題名（和文）エラスチン含有ハイドロゲルの力学的特性の評価と脊柱靭帯再生用材料への応用

研究課題名（英文）Mechanical properties of elastin hydrogels and its application to biomaterials for spinal ligament repair

研究代表者

山本 衛（Yamamoto, Ei）

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：00309270

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：コラーゲンとエラスチンは、靭帯、皮膚などの生体軟組織のなかで支持構造体を形成している。コラーゲンは、生体材料などの応用分野で幅広く使用されている。これに対して、エラスチンの医療分野での応用はコラーゲンと比較して非常に遅れている。我々の研究グループでは、魚類由来エラスチン材料の生体医工学的応用を指向した研究を実施した。エラスチンをバイオマテリアル化するには、エラスチン材料の力学的特性や生体適合性に関するデータが不可欠である。そこで本研究では、エラスチン材料に対する力学試験と、エラスチン被覆基材を用いた線維芽細胞の培養実験を行い、エラスチン材料と生体軟組織との力学的相違や細胞毒性について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エラスチンの生化学的、分子生物学的、および生体力学的な基礎特性に関しても未解明な部分が多く残されており、バイオメディカル分野への応用も全く進展していない。エラスチンを含有する材料の作製方法を確立し、作製した材料の力学的特性を定量的に評価する研究はこれまでに Rowe れられておらず、その基礎科学的価値が高いだけでなく、水分を多く含む生体軟組織の再生用材料の開発などの生体医工学的応用へと繋がっていくものと予想できる。さらなる波及効果として、より発症頻度の高い腰痛などの整形外科的疾患の予防、対処方法の改良に対しても、エラスチンに着目した本研究の結果を発展させていくことが可能であると推察される。

研究成果の概要（英文）：Elastin and collagen are main extracellular matrix in biological soft tissues such as ligaments, arteries, and skins. Collagen is widely used in various application fields including cosmetics, health foods, and biomaterials. Due to the difficulty to obtain pure ingredient, however, only a few basic and applied studies have been conducted on elastin and it has not rarely used in the biomedical field. Our overall goal is to develop a new strategy to repair or regenerate the damage of biological soft tissues. For this goal, we investigated the mechanical properties and biocompatibility of elastin materials made of fish bulbous arteriosus in the present study. We conducted mechanical loading tests for elastin materials. Moreover, fibroblasts were cultured on the material surface coated by elastin. From these experiments, the basic data on the deformability and cytotoxicity are available for the elastin materials. These data are essential to used elastin as biomaterials or cell scaffolds.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス エラスチン 生体軟組織 靭帯 力学的特性 生体適合性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚や血管、腱・靭帯などの生体軟組織に含まれるコラーゲンとエラスチンは、代表的な細胞外マトリックスである。これら両成分は、線維性の高分子であり、様々な組織中で支持構造を担う材料として、その役割を果たしている。コラーゲンは強靱な線維であり、組織の剛性や破断特性と密接に関連していると考えられている。一方、エラスチンは低剛性、低強度の特徴を有する線維であり、組織の伸展性や弾性を支配する主要素とみなされている。コラーゲンは生体適合性などの性質において、多くの利点を有する材料であり、組織工学や再生医療の分野で多く利用されている。純度の高いコラーゲンを容易かつ大量に精製する手法が確立されているのに対して、大量のエラスチンを高純度で精製することは非常に難しく、これに起因してエラスチンを対象とした研究は極めて少ないのが現状である。さらに、エラスチンの生化学的、分子生物学的、および生体力学的な基礎特性に関して未解明な部分が多く残されており、バイオメディカル分野への応用も全く進展していない。エラスチンを含有するハイドロゲルの作製方法を確立し、作製した材料の力学的特性を定量的に評価する研究はこれまでに終わっておらず、その基礎科学的価値は高いだけでなく、水分を多く含む生体軟組織である靭帯の再生用材料の開発などの生体医工学的応用へと繋がっていくものと予想される。また波及効果として、より発症頻度の高い肩こりや腰痛などの整形外科的疾患の予防、対処方法の改良に対しても、エラスチンに着目した本研究の結果を進展させていくことが可能であると推察される。

### 2. 研究の目的

本研究では、エラスチンを利用した靭帯の機能維持や疾患治療の手法開発を念頭に、エラスチンの生体軟組織における力学的寄与や、エラスチン含有ハイドロゲルの力学的特性に関する基礎的知見を取得する。このように、エラスチンの生内における力学的機能を同定し、エラスチン材料の力学的特性を定量化することで、脊柱靭帯の損傷や疾患に対する組織再生用バイオマテリアルとしてのエラスチンの有用性を探求することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

本研究では、生体高分子材料であるエラスチンのバイオマテリアル化技術の確立を最終目標とし、引張試験ならびに押し込み試験によってエラスチン材料の応力 - ひずみ関係、弾性率、応力緩和特性を計測した。この際には、エラスチン材料の力学的特性に及ぼす成分濃度や架橋剤濃度の影響について検討した。本実験では、魚類動脈球より精製したエラスチンを使用した。さらに、精製されたエラスチンの中から、分子量が比較的小さいエラスチンを分離して実験に用いた。次に、エラスチン含有材料を作製するため、DMSO (ジメチルスルホキシド) に濃度 100 もしくは 200 mg/ml でエラスチンを溶解した。また、架橋剤には比較的高い細胞親和性を有する HMDI (ヘキサメチレンジイソシアネート) を用いた。エラスチン溶液に対して架橋剤濃度が 15% と 30% になるように添加してエラスチン材料を作製した。作製したエラスチン材料の力学的特性を引張負荷試験および押し込み試験によって評価した。小型材料試験機を用いて、引張速度 10 mm/min で材料が破断するまで負荷を作用させ、試料の応力 - ひずみ線図を算出した。また、押し込み速度 1 mm/min でステンレス鋼製球状圧子 (半径 2.25 mm) を材料表面から 0.5 mm の位置まで押し込んだ。その後、この押し込み変位を 300 秒間維持し、その間の荷重緩和を計測した。得られた負荷時の押し込み荷重 - 変位関係から、ヘルツの接触理論から導かれる式を用いてエラスチン材料の弾性率を算出した。このような力学試験によって、エラスチン濃度や架橋剤濃度によって変化するエラスチン材料の力学的特性を定量的に評価した。

脊柱靭帯の一種である黄色靭帯に対して力学試験を実施し、エラスチンが靭帯において果たしている力学的機能についての知見を得ることを試みた。成熟家兔の黄色靭帯を実験に用いた。靭帯試料を 37 に保ったエラスターゼ溶液もしくはコラゲナーゼ溶液に 3 時間浸漬させた。各試料のエラスターゼ処理もしくはコラゲナーゼ処理を施した群を、それぞれ Elastase 群と Collagenase 群とした。また、何の処置も施さなかった試料を Control 群とした。自作の生体軟組織用断面積測定装置を使用して、皮膚試験片の断面積を測定した。この装置には、レーザー変位計が組み込まれており、非接触で生体軟組織の断面積を測定することが可能である。レーザーを試料の表面へ照射することで試料の厚みを求め、この測定を 0.1 mm 間隔で試料の幅全体に対して実施した。この後、得られた測定値をもとに試料の断面形状を多角形近似することで、断面積を算出した。断面積は、試料の中央及びその上下 2 mm の位置の合計 3 か所で測定し、それらの平均値を試験片の断面積とした。引張試験には、万能材料試験機 (EZ Test, 島津製作所) を使用した。黄色靭帯の試料では、靭帯両側に存在する椎骨を把持することで試験片を材料試験機に設置し、引張速度 1 mm/min で試験片が破断するまで負荷を作用させた。

魚由来エラスチンをバイオマテリアル化するには、生体適合性の確認することが不可欠である。そこで本研究において、エラスチン被覆基材を用いた線維芽細胞の培養実験を行い、エラスチン材料が細胞の増殖や遊走に及ぼす影響について検討した。マグロ動脈球より精製した可溶性エラスチンを 0.1% の濃度で含む溶液をポリスチレン製培養デッシュに注ぎ、60 のドライオープン中に 12 時間静置することで、デッシュ表面にエラスチンを被覆させた。このようにし

て作製したエラスチン被覆表面の上に、マウス由来線維芽細胞 (NIH/3T3) を  $1 \times 10^4$  個/mL の濃度で播種した。細胞が培養容器の接着面を覆いつくす状態になるまで、培養開始から 3 日間の細胞培養実験を行った。

#### 4. 研究成果

Fig. 1 に引張試験をより得られたエラスチン材料の応力 - ひずみ線図を示す。エラスチン濃度が 100 mg/ml の試料の破断応力と破断ひずみは、それぞれ  $1.4 \pm 0.5$  MPa と  $10.2 \pm 1.5\%$  であった。これに対して、高濃度 (200 mg/ml) で作製した材料では、強度と伸展性の双方で増加する傾向が認められ、破断応力と破断ひずみは、それぞれ  $1.9 \pm 0.7$  MPa と  $39.3 \pm 1.1\%$  であった。エラスチン濃度 100 mg/ml および架橋剤濃度 15% の試料に対する押込み試験を実施したところ、弾性率は約 60 kPa、荷重緩和率は約 38% であった。さらにエラスチン濃度は変更せずに架橋剤濃度 30% とした試料では、弾性率が約 1625 kPa、荷重緩和率が約 21% となった。このように架橋剤濃度が上がると、弾性率が高値となる一方で、荷重緩和については減少していく傾向がみられた。

ラット黄色靭帯の Control 群、Collagenase 群、Elastase 群の応力 - ひずみ線図を Fig. 2 に示す。Elastase 群の破断応力は Control 群よりも低値であった。これらの結果より、エラスチンの分解によって靭帯の力学的特性は大きく変化することが示唆された。黄色靭帯では約 70 ~ 80% がエラスチンで構成されている。このような高いエラスチン含有率の黄色靭帯では、エラストマーによる力学的特性の変化においても顕著であることが確認された。エラスチンは、コラーゲンなどの他の構成要素とともに、生体軟組織内で力学的な相互作用を有するネットワーク構造を形成しており、1 つの成分の欠如であっても、組織の特性に多大な影響を及ぼすものと考えられた。Fig. 2 より、無処置の Control 群では、破断応力が約 1.3 MPa と破断ひずみが約 80% であった。これらの値をエラスチン材料と比較した場合、材料強度に関しては靭帯とほぼ同程度もしくは上回る特性をエラスチン材料は有しているが、伸展性に関しては大きく異なることが明らかとなった。本研究で作製した材料は、エラスチンのみを含んでいる単一成分で構成されていることから、生体の靭帯のように複数成分を含んでいるような構造を有していない。今後は材料の複合化などを実施して、材料の伸展性を向上させることを試みる必要がある。

エラスチン被覆基材上で培養した線維芽細胞の増殖率は、ポリスチレン製デッシュ上で培養した場合と同程度であった。また、エラスチン被覆表面に接着した細胞では、遊走速度に低下の傾向が認められ、エラスチン表面上に長時間にわたり存在する様子が観察された (Fig. 3)。体内の多くの細胞においては、エラスチン受容体の存在が明らかになっている。従って、エラスチンをバイオマテリアルとして有効に利用することは、組織の硬化がみられる種々の疾患に対する治療戦略に多大な影響を及ぼす可能性があるものと推察された。

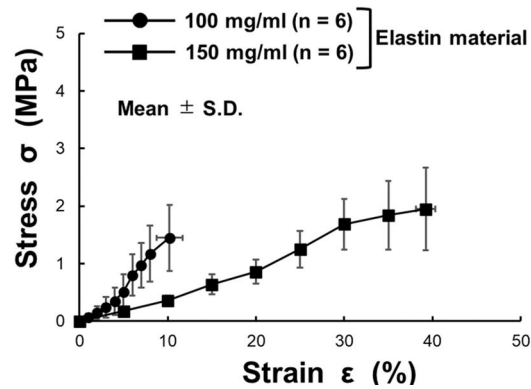


Fig. 1 エラスチン材料の応力 - ひずみ線図

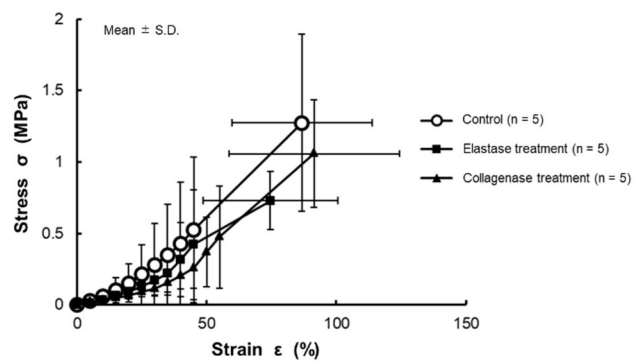


Fig. 2 酵素処理した黄色靭帯の応力 - ひずみ線図

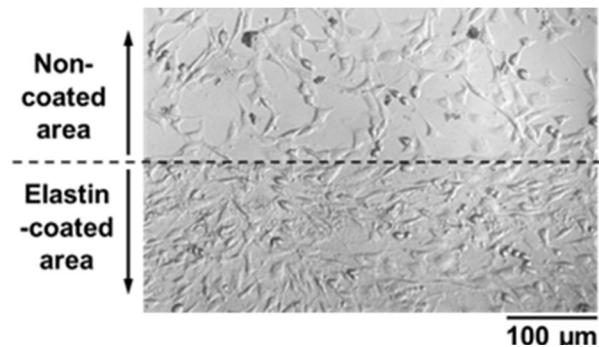


Fig. 3 エラスチン基材上で培養した線維芽細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 山本衛, 川村勇樹	4. 巻 72
2. 論文標題 総説：脊柱を構成する靭帯の力学的特性	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 非破壊検査	6. 最初と最後の頁 137-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yamamoto, E., Kawamura, Y., Takemori, K., Ito, H.
2. 発表標題 Development of biomimetic elastin materials with similar extensibility to skin tissues
3. 学会等名 The 9th World Congress of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本衛, 川村勇樹, 竹森久美子, 伊藤浩行
2. 発表標題 エラスチン成分に着目した生体軟組織の力学的特性の評価
3. 学会等名 日本実験力学学会2021年度年次講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamamoto, E., Kawamura, Y., Takemori, K., Ito, H.
2. 発表標題 Mechanical evaluation of biological soft tissues focusing on elastin ingredients
3. 学会等名 The 16th International Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamamoto, E., Takenori, K., and Kawamura, Y.
2. 発表標題 Mechanical properties of biological soft tissues treated by enzymes
3. 学会等名 The Advanced Technology in Experimental Mechanics and International DIC Society Joint Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山本 衛 (生物理工学部 医用工学科) <a href="https://research.kindai.ac.jp/profile/ja.b80fd603dffcac81.html">https://research.kindai.ac.jp/profile/ja.b80fd603dffcac81.html</a>
--

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

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
---------	---------