

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32613

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650294

研究課題名(和文) ナマココラーゲン線維を用いた細胞培養法の開発

研究課題名(英文) Development of cell culture methods using sea cucumber collagen fibrils

研究代表者

今村 保忠 (Imamura, Yasutada)

工学院大学・工学部・教授

研究者番号：40201339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ナマココラーゲン線維を用いた新規の細胞培養法を開発した。ナマコ体壁よりコラーゲン線維の単離及び精製法を改良し、培養基質として利用可能にした。線維形態や線維間相互作用に関する因子等を明らかにし、本線維の化学的な性状を検討した。線維間相互作用を利用して、さらに高次の線維会合体の形成も行った。また、培養基質として種々の細胞の培養に供したところ、調べた全ての細胞に良好な接着性を示した。このコラーゲン線維を用いた培養では細胞塊や微小血管内腔様の細胞構造体を作成された。また、骨分化細胞培養系では分化促進が観察され、ナマココラーゲン線維の表面性状が、再構成コラーゲン線維と異なる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We have developed newer methods to culture cells by using sea cucumber collagen fibrils as culture substrates. Various conditions were examined for extraction and purification of the collagen fibrils from the body wall dermis in the animal and it became possible to use the fibrils for cell culture. Chemical properties were also demonstrated by showing micro morphology of the fibrils and factors affecting interactions between the fibrils. Some higher order aggregates from the collagen fibrils were formed on the basis of our knowledge about the inter-fibrillar interaction. The collagen fibrils were found to be a good substrate for cell adhesion with various cells examined. Cellular clumps or cellular networks such as capillary like structure were formed under the new culture condition. The collagen fibrils promoted bone differentiation demonstrated by the deposition of apatite with cell culture system. The result indicates the unique surface property of the collagen fibrils.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：コラーゲン コラーゲン線維 細胞培養 ナマコ 血管内皮細胞 骨形成 管腔形成 アパタイト

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは再生医工学の生体材料として種々の利用法が開発されている。主には、3本らせん構造をほとんど持たないゼラチンを原料として用いたもの、アルカリ処理や酸性中の酵素処理により抽出した3本らせんを有する分子、あるいはそれから再構成したコラーゲングルや会合体を用いたものである。組織の被覆材や組織構築における培養基質として利用されている。

ナマコなど棘皮動物の体壁存在する結合組織は、キャッチ結合組織と呼ばれ、体壁の固化や棘の運動に筋肉に代わって利用されている。体壁中のコラーゲンは、ヒトなどと異なり、分岐のないコラーゲン線維を形成している。ナマコ体壁を還元剤、キレート剤、高濃度 NaCl を含む溶液中に放置すると、体壁が溶解し、コラーゲン線維が分散してくる (Matumura, T., et al., J. Biochem, 1973, Vol. 73, 155-162)。一方、ウシV型コラーゲン再構成線維も、分岐が少なく、径の細い線維を形成するが、これを用いると細胞の凝集を誘導することが可能であった (Kihara, T., et al., Cell Tissue Res, 2004, Vol. 318, 343-352)。このような経緯で本研究では組織の部分構造を有するナマココラーゲン線維を細胞培養系に利用する着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、ナマココラーゲン線維が培養基質としてどのように利用できるかを検討する。正常細胞 (線維芽細胞、血管内皮細胞など) あるいは腫瘍細胞 (HT-1080 など) や前分化細胞 (PC-12、MC3T3-E1) を用い、コラーゲン線維への接着を検討し、細胞の種類と相互作用の有無を調べる。予備的な実験でナマココラーゲン線維を細胞懸濁液に添加すると、短時間で細胞が凝集し、細胞塊を形成することを見いだした。このようなナマココラーゲン線維による細胞塊形成を利用し、分化誘導を検討する。また、できた細胞塊の安定性を検証し、皮膚などの組織代替物として利用可能か検討する。

3. 研究の方法

(1) コラーゲン線維の単離法の改良

ナマコ体壁より松村らの方法でコラーゲン線維を分散し、遠心法により大まかなコラーゲン線維の精製を行っている。精製の再現性には問題があり、安定的にコラーゲン線維を供給するために、コラーゲン線維の精製に影響を及ぼす因子 (イオン強度、pH、還元剤、2価イオンの有無など) を検討し、改良を図る。

(2) ナマココラーゲン線維の性状の検討

コラーゲン線維の安定性に関しては、培養条件でどの程度線維の形や性質が維持でき

るのかを調べる。ナマコ体壁溶解液中ではコラーゲン線維は安定であることは分かっている。これとの対比で安定性に影響を及ぼす因子を明らかにする。また、このコラーゲン線維の特徴は、光学顕微鏡で1本ずつ線維を観察できることである。再構成コラーゲン線維では難しいが、ナマコ由来の線維では容易である。AFMを使ってコラーゲン線維の形状を観察し、石灰化や細胞との相互作用を検討する上の基礎的なデータとする。

(3) ナマココラーゲン線維の培養基質としての利用：細胞塊形成条件の確立コラーゲン線維の培養基質としての利用

種々の細胞を入手し、コラーゲン線維へ接着の有無を観察する。これまでにヒト皮膚線維芽細胞、PC12細胞では検討を進めている。その他 HT-1080、血管内皮細胞 (HUVEC、HAEC) などを用いる。タイムラプス観察を行い、細胞がコラーゲン線維を引き合い、最終的に細胞塊を形成する様子を観察する。また Calcein-AM を用いた蛍光染色法により細胞塊内で生細胞の確認や培養持続時間を検討する。

(4) コラーゲン線維の利用法の展開：特に超高次構造体形成法の確立

ナマコ体壁溶解液を酸性溶液に注入すると溶液はゲル状になり、取り出して風乾すると糸状になることを見いだした。一般にコラーゲンは酸性中では分子間の反発が大きく溶解性が増すが、この試料の場合は全く逆の性質を示した。この糸の物理的な強度を調べ、生体材料としての利用法を検討する。また、糸の中でコラーゲン線維がどのように配向しているか、電子顕微鏡等により観察し、腱のコラーゲン線維配向と比較する。糸を集め束にすることで一定の強度を付与できれば、縫合糸や人工腱などの医用材料としての利用を検討する。また、線維間の相互作用は中性条件で Ca イオンによる制御も可能である。膜や円柱などの形状に成形できるか検討する。このように線維がベースとなった超高次構造体上で細胞培養を行い、細胞の分化や増殖性について検討する。

(5) 細胞塊の安定化と細胞の分化制御

細胞塊をつくる細胞の種類を特定し、細胞塊の安定性を検討する。MC3T3-E1細胞や間葉系幹細胞を用い、骨化分化誘導能を検討する。分化可能な場合は、組織に包埋することを検討する。また、長期間安定に分化状態を維持できることがわかれば、組織代替物として生理活性物質のモニターに利用する。

4. 研究成果

(1) コラーゲン線維の単離法の改良

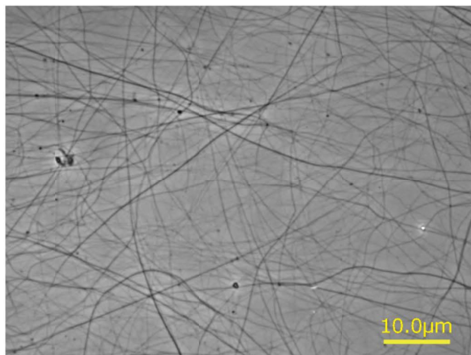
ナマココラーゲン線維の精製の再現性には問題があり、安定的にコラーゲン線維を供給するために、コラーゲン線維の精製に影響を及ぼす因子を検討した。その結果、中性条件では二価や三価のカチオンは線維を凝集

させること、酸性条件では線維が凝集することが分かった。また、グリセロールは線維間の相互作用を強め、メチルセルロースは弱めることが示唆された。低速と高速の遠心操作を組み合わせることで比較的容易に線維の部分精製が可能になった。精製された試料中には、SDS-PAGE 後の糖染色から判断する限り、多糖類の混入は認められない。ペプシン処理では、コラーゲン分子は抽出されないが、残渣中に SDS-PAGE で分析可能なコラーゲンポリプチドが存在した。サイズはほぼ動物コラーゲン 1(1)と同程度であった。

(2) ナマココラーゲン線維の性状の検討

本コラーゲン線維は、培養条件で少なくとも培養期間は線維の形や性質を維持した。このコラーゲン線維は、光学顕微鏡で1本ずつ線維を観察でき、再構成コラーゲン線維では難しいが、ナマコ由来の線維では容易であった(図1)。

図1 位相差顕微鏡によるナマココラーゲン



線維の観察

また、AFMを使ってコラーゲン線維の形状を観察したところ、コラーゲン線維のDバンドに相当する凹凸が観察された(図2)。

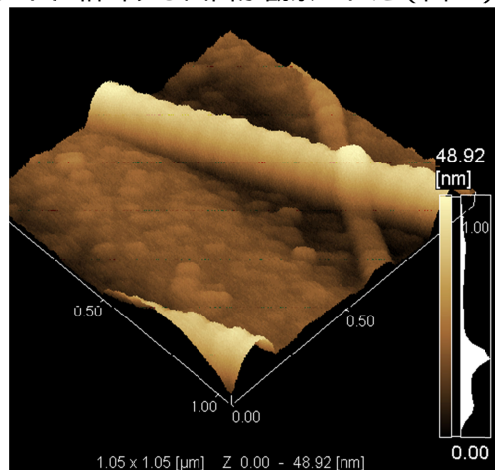
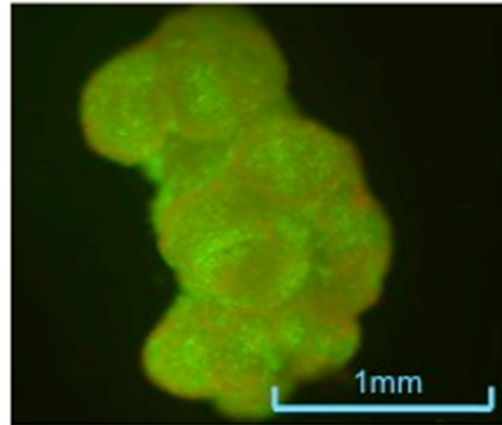


図2 ナマココラーゲン線維のAFMによる観察

(3) ナマココラーゲン線維の培養基質とし

ての利用：細胞塊形成条件の確立コラーゲン線維の培養基質としての利用

種々の細胞を入手し、コラーゲン線維へ接着の有無を観察した。ヒト皮膚線維芽細胞を含め種々の細胞(PC12, HT-1080, HUVEC, NIH-3T3E1)で検討したところ、いずれに対してもよい接着性を示した。また、タイムラプス観察を行い、細胞がコラーゲン線維を引き合い、最終的に細胞塊を形成する様子を観察した。Calcein-AMを用いた蛍光染色法により細胞塊内で生細胞の確認した(図3)。図3 形成された細胞塊のCalcein-AM(生細胞、緑色)とPI(死細胞、赤)による染色



細胞塊形成の時間経過を調べ、図4のような細胞塊形成モデルを考案した。ナマココラーゲン線維は培養液中で、血清由来のフィブロネクチンと会合し、透明なシート様の浮遊した会合体を形成する。このシート様構造体に細胞が吸着し、細胞がシート状に広がると同時に、周辺部が厚みを増す。内部の細胞が周辺部に移動するとひも状の細胞集合体ができ、さらに細胞運動を経て細胞塊に変化していく。

図4 ナマココラーゲン線維による細胞塊



形成モデル

血管内皮細胞を用いた場合、浮遊状態で微小管腔様の細胞のネットワークが形成された(図5)。この細胞のネットワークの形態や安定性は、マトリゲル上で形成される微小管腔構造と類似していた。これも細胞塊と同様にナマココラーゲン線維の浮遊したシート様構造体上で起きた。

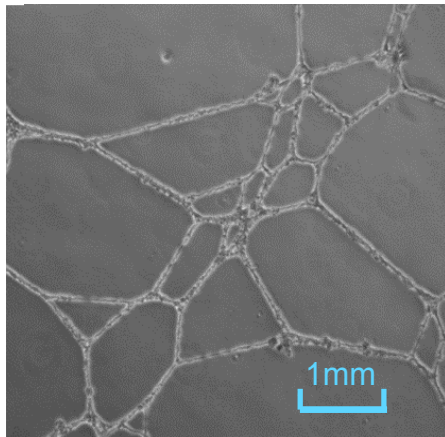


図5 血管内皮細胞によるナマココラーゲン線維上での微小管腔様構造の形成

(4) コラーゲン線維の利用法の展開：特に超高次構造体形成法の確立

ナマコ体壁溶解液を酸性溶液に注入すると溶液はゲル状になり、ピンセット等で取り出すことが可能であった(図6)。



図6 ナマココラーゲン線維系の形成

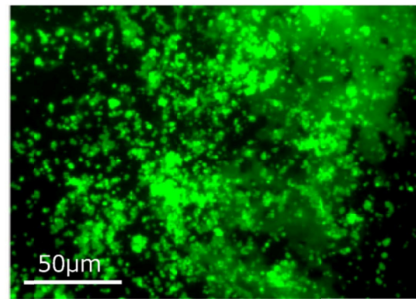
これを風乾すると糸状になった。この期間の研究では医用材料としての展開はできなかった..

線維間の相互作用は中性条件で Ca イオンによる制御でき、膜や円柱などの形状に成形は可能であった。

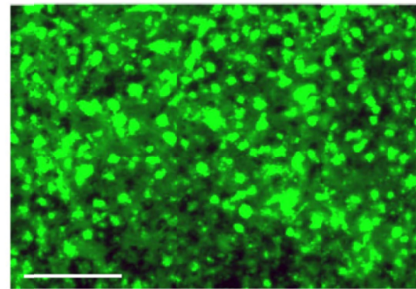
(5) 細胞塊の安定化と細胞の分化制御

細胞塊は、さまざま細胞を用いて作成することができた。細胞が凝集する程度は、コラーゲンへ細胞接着能を反映していると考えられた。また、細胞塊は、単なる浮遊培養より細胞が長期にわたり生存した。10日程度の生存までは確認された。

MC3T3-E1 細胞を用い、骨化分化誘導能を検討した。図7はその結果である。I型コラーゲン再構成線維に比較しナマココラーゲン線維は、Calcein の蛍光で染色したリン酸化 Ca の沈着を促進した。ナマココラーゲン線維が再構成コラーゲン線維と、線維表面の性状が異なることを示している。骨分化に関し、制御因子となりうることが分かった。



I型コラーゲン線維コート (300µg/ml)



ナマココラーゲン線維コート (300µg/ml)

図7 MC3T3-E1 細胞骨化分化誘導に及ぼすI型コラーゲン再構成線維とナマココラーゲン線維の影響

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 3件)

1) E. Yasui, K. Takayama, T. Nakago, N. Takeda, Y. Imamura, S. Nagumo Synthesis and evaluation of a cyclopropane derivative of DHMEQ. Chem. Pharm. Bull. 62,304-307(2014)

2) K. Mizuno, Y. Imamura(5人中3番目) Reconstituted Type V Collagen Fibrils with the Chain Composition of 1(V) 2(V) 3(V) Respective of the D-Periodic Banding Pattern, Connective Tissue Research, 54(1), 41-48(2013)

3) T. Watanabe, Y. Imamura(7人中2番目) Concerted and adaptive alignment of decorin dermatan sulfate filaments in the graded organization of collagen fibrils in the equine superficial digital flexor tendon, Journal of Anatomy, 220, 156-163 (2012)

[学会発表](計 4件)

1) 五十嵐淳, 今村保忠(6人中6番目) ナマココラーゲン線維によるアパタイトの沈着促進, 第46回日本結合組織学会・第61回マトリックス研究会大会合同学術集会、名古屋(2014)

2) 五十嵐淳, 今村保忠(5人中5番目)、型コラーゲンの3本らせん形成に及ぼす細

胞培養条件の影響, 第 46 回日本結合組織学会・第 61 回マトリックス研究会大会合同学術集会、名古屋 (2014)

3) Y. Imamura (他 6 名), Sea Cucumber Collagen Fibrils as Cell Culture Substrates, 9th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 香港 (2013)

4) 新保貴久、辛英哲、今村保忠 ナマコ由来コラーゲン線維を用いた血管内皮細胞の管腔形成、第 44 回日本結合組織学会・第 59 回マトリックス研究会大会合同学術集会、東京 (2012)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
今村保忠 (IMAMURA, Yasutada)
工学院大学・工学部・教授
研究者番号：40201339

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
辛英哲 (SHIN, Yong Chol)
工学院大学・工学部・准教授
研究者番号：20291734