

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420761

研究課題名(和文) コラーゲン線維の配向組織制御による再生医療技術の開発と新素材応用

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine techniques by control of collagen fiber orientation and application of new materials

研究代表者

葛巻 徹 (Kuzumaki, Toru)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：50396909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：断裂した腱の断端から分泌される腱ゲルは、張力が印加されることでコラーゲン線維組織が再生される。本研究では、腱ゲルの再生を促進させる適切な張力印加モードと、張力を腱ゲルに加える最適なタイミングの評価を引張試験と構造解析で行った。赤外線分光解析は、3日間または5日間生体内で保持した腱ゲルから得られた特徴的なピークが10日目のそれでは消失したことを明らかにした。この結果は、腱ゲルに張力を加えるべき最適なタイミングは10日目であることを示している。通常の引張試験では、腱ゲルは細い紐状に伸長し、形成されたコラーゲン線維の最大直径はマウスの正常なアキレス腱のそれよりも約45倍太くなった。

研究成果の概要(英文)： Tendon gel secreted from a parent tendon is regenerated by applying the tension. However, the detailed condition of tensile stimulus to promote regeneration of tendon gel has never been clarified yet. In this study, evaluations of an appropriate tensile mode and of the optimum timing of applying the tension to tendon gel were conducted by tensile tests and structural analyses. An infrared spectroscopy revealed that characteristic peaks that appeared in tendon gel on day 3 and day 5 disappeared in tendon gel on day 10. Disappearance of the peaks means maturity of tendon gel and it show us the optimum timing that the tension should be applied to tendon gel. The effect of tensile load on tendon gel preserved for 10 days was investigated by various tensile tests. In normal tensile test, tendon gel was elongated into a thin cord of collagen fibres, and the maximum diameter of a collagen fibre was approximately 45 times large than that of the normal Achilles tendon of mice.

研究分野：ナノ材料計測科学

キーワード：生体材料 再生医療 コラーゲン線維 人工腱 人工靭帯 リガメントゲル 材料工学 新素材応用

1. 研究開始当初の背景

現在、日本は高齢化社会を迎えている。また、都市化、生活の利便化の影響を受けて、運動不足に陥りやすい生活環境にあり、現代社会では身体を動かす機会が減っている。それに伴い中高年者の積極的なスポーツへの参加が公的にも推奨されている。スポーツは、体を動かすという人間の本源的な欲求にこたえたとともに、爽快感、達成感、他者との連帯感等の精神的充足や楽しさ、喜びをもたらし、さらには、体力の向上や、精神的なストレスの発散、生活習慣病の予防など、心身の両面にわたる健康の保持増進に資するものである。しかしその一方で、激しい運動は中高年者にとって心臓への負担が大きく、不整脈や運動後の血圧の低下など、危険な状況に陥る事が多々見受けられる。そればかりでなく、骨折や関節・筋肉・腱などにも障害を起こし痛みなどを起こすようになってしまう。また、これによる障害の慢性化が新たな問題として浮上している。そこでけがの心配なく元気で活力のある日常生活を送るために、簡便で確実な修復方法が要求されている。特にアキレス腱の損傷・断裂に関しては、修復方法の研究があまり進んでいない現状にある。現在あるアキレス腱の修復方法は保存方法と手術方法がほとんどであり、どの方法にも半年間ほどの治療期間がかかってしまう。これにより社会復帰が遅れるなどの悪影響が生じている。もし簡便な修復方法が確立されれば、経済活動の活発化や医療費の削減に繋げることが期待できると同時に、中高年がスポーツにより生きがいを持つことができ、quality of life の向上に繋げることができると思われる。

2. 研究の目的

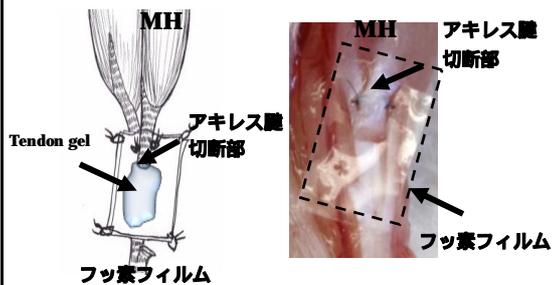
アキレス腱の断裂や靭帯損傷の修復に対する研究はあまり進んでいない。正常な腱では主成分の膠原線維(コラーゲン線維)は全て一方向に配向した組織を呈しているが、一度断裂や損傷を受けた腱・靭帯がどのような機序によってコラーゲン線維の合成・縦列化が進み、断裂した腱が再生するのかが不明であった。近年、断裂したマウスのアキレス腱から採取した分泌物(tendon gel)に数日間継続的に引張応力をかけることで、応力印加方向にコラーゲン線維束が太く配向する現象が見出され、人工腱形成のための基礎的知見が得られた⁽¹⁾。そこで本研究は、応力場が tendon gel 組織に与える影響を定量的に評価することでコラーゲン線維の応力誘起自己組織化現象の発生機序の解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料作製

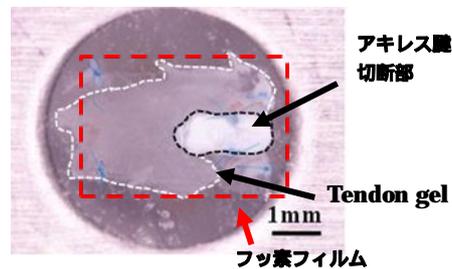
試料作製には腱の断端から分泌された tendon gel を2枚のフィルムに挟むフィルムモデル法^[2]で行った。フィルム間にできる試料の厚さが 20 μm と薄いので薄切なしで光学顕微鏡によりその場観察を可能とする。以下に作製手順を示す。

1. マウスアキレス腱のうち内側頭の腱(MH)を眼科手術用ハサミで切断(図1(a))
2. フッ素系樹脂フィルム(Aflex, 旭硝子社製)3×4mm の上に、切断端を医療用針付き 10-0 ナイロン縫合糸で結紮固定
3. 生体内で10日以降まで温存し、試料を取り出した(図1(b))



(a) フィルムモデル法による試料作製過程

10 日以降に抽出



(b) 応力印加用試料

図1 フィルムモデル法により作製した tendon gel 試料

(2) 引張試験

本研究室で独自に開発したナノ材料試験機を用いて引張試験を行った。ナノ材料試験機は、モーター及びピエゾ素子により可働ステージを前後させ引張及び圧縮試験を行うことが出来、その際の荷重はロードセルにて検出出来る機構になっている(荷重分解能 10^{-5}N)^[3]。Tendon gel 試料をナノ材料試験システムの両ステージ間に固定した(図2)。引張試験は、図3に示したナノ材料試験システムを用いて荷重 - 変位曲線の計測及びその場観察を行った。引張速度は約 20 $\mu\text{m/s}$ である。今回使用した試料は生体内で3日目、5日目、10日以上で温存する期間を変えた試料を使用した。

(3) フーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)による構造解析

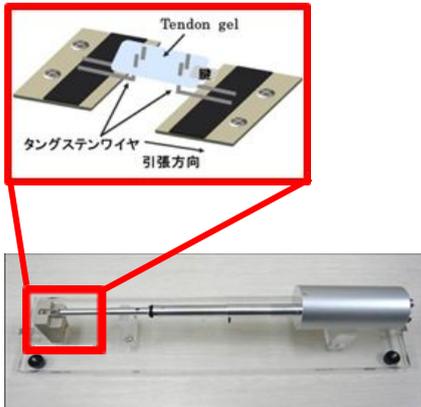


図2 ナノ材料実験機



図3 ナノ材料試験システム

引張試験で使用した試料を FT-IR(Jasco IRT5000、FT/IR4200typeA) を用いて構造解析を行った。測定条件は透過測定モード、アパーチャ径 $50 \times 50 \mu\text{m}$ 、積算回数 40 である。

(4) 原子間力顕微鏡 (AFM) による表面観察

AFM (Veeco Dimension 3100) を用いて、引張試験で使用した試料、正常なアキレス腱の表面観察を行った。観察時は試料表面にエタノールを滴下して乾燥させたものを使用した。観察条件はタッピングモードで行い、カンチレバーは NCHV - 10V を使用した。

4. 研究成果

(1) FT-IR による構造解析と AFM による表面観察

10 日目以降まで成熟した tendon gel に張力を印加することで、コラーゲン線維が配向することが確認された。張力印加時にコラーゲン線維がどのようにして配向を始めるのか張力印加初期組織を AFM で観察した。図 4、に成熟期間が 5 日目の試料の引張試験後の AFM 像を示した。3 日目、5 日目の試料は張力を印加してもコラーゲン線維の配向を確認することが出来なかった。コラーゲン線維の

配向組織は 10 日以上生体内で成熟させたもののみで観察されることが報告されている^[1]。これは tendon gel 内でのコラーゲン分子の形成に 10 日間程要するためであり、成熟期間が 3 日目、5 日目の試料ではコラーゲン分子が完成されていないため分子間の架橋と線維組織の配向がおこらなかったと考えられる。また、 $1500\text{cm}^{-1} \sim 1300\text{cm}^{-1}$ の領域 (図 5 赤い点線で囲った部分) で 3、5 日目の引張前後でピーク形状の違いが確認された。これは 3、5 日目の試料では、プロコラーゲンペプチターゼが接合しているが、成熟期間が 10 日目以降ではそれが分裂しコラーゲン分子が完成したためにピーク形状に違いを生じたと考えられる。

図 6(a) ~ (d) に成熟期間が 10 日目の試料の応力印加前後、正常なアキレス腱の AFM 像を示す。応力印加は引張試験で得られたデータを基に組織変化の初期過程を調べることを目的として決定した。図 6(b) は約 0.5MPa の応力、図 6(c) はやや大きめの約 2.5MPa の応力を印加した試料を観察したものである。図 6(a) より応力印加なしの場合、コラーゲン線維の配向は確認できず、凹凸のある形状であることが分かった。一方、図 6(b)、(c) では応力印加方向にコラーゲン線維が配向し周期的な横紋がある線維組織が観察できた。これは、コラーゲン線維が成長していく過程においてコラーゲン分子同士がアルドール縮合型架橋でコラーゲン線維が形成され、次にコラーゲン線維間でシッフ塩基型架橋が起こったためと考えられる^[5]。

張力の印加によってコラーゲン分子間に架橋 (アルドール縮合型架橋) が起こるとその反応により飽和脂肪族アルデヒド基 (CHO 基) が生じる。その変化が図 5 の IR スペクトルの赤矢印で示した所にピークとして表れている。また、架橋反応が進むと今度はコラーゲン線維間の架橋 (シッフ塩基型架橋) が生じるが、この変化は図 5 の IR スペクトル上の黒矢印で示した所にピークの変化として表れていると考えられる。図 5 から OH 基に由来するスペクトルのピーク位置 (図 5 破線) が応力印加前では 3289cm^{-1} 、応力印加後では 3294cm^{-1} 、正常な腱線維では 3323cm^{-1} と高波数値としてシフトする傾向が得られた。 3300cm^{-1} 付近のピークは、個々のコラーゲン線維にある OH 基に起因するピークである。このピーク位置の変化はコラーゲン分子が集まり線維を形成していく過程、もしくは、線維化したコラーゲンが束になって腱が修復される過程で OH 基の隣接位構造が変化したことに起因している可能性がある。正常な腱線維が形成されると CHO 基のピークが消失しているが、これは線維間の架橋 (シッフ塩基型架橋) が優位になったことで CHO 基が消失したためと考えられる。図 6(b)、(c) で観察されるコラーゲン線維の直径はそれぞれ $54 \pm 20\text{nm}$ 、 $61 \pm 12\text{nm}$ であった。コラーゲン分子の直径は約 1.5nm であることから (b)、(c)

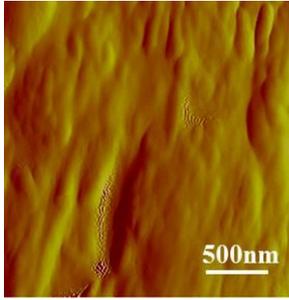


図4 5日目試料の引張後

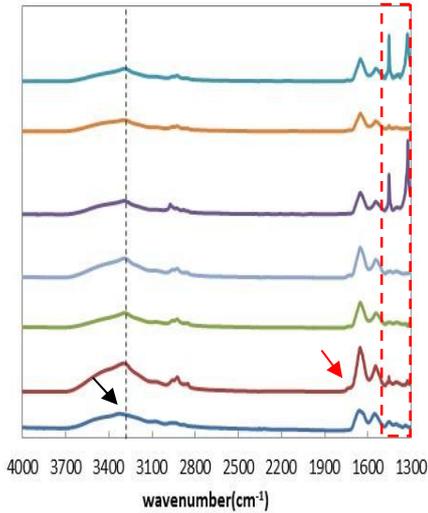
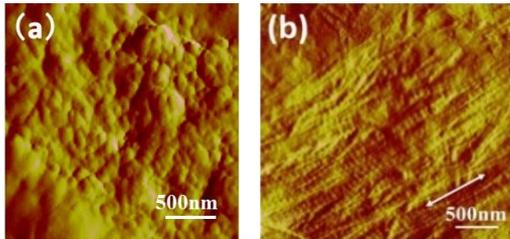
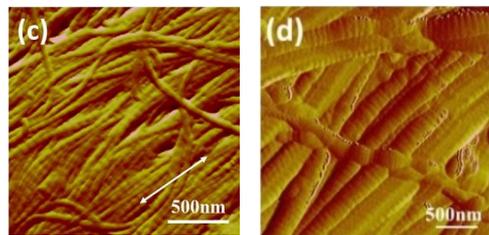


図5 IR スペクトル

- 3日目引張前
- 3日目引張後
- 5日目引張前
- 5日目引張
- 10日目引張
- 10日目引張
- 腱繊維



(a)張力印加無 (b)張力印加(約0.5MPa)



(c)張力印加(約2.5MPa) (d)アキレス腱

図6 コラーゲン線維のAFM像
矢印の方向が張力印加方向
のコラーゲン線維の直径はそれぞれコラーゲン分子 36 ± 13 本、 41 ± 8 本分相当であると

考えられる。図6(d)の正常なアキレス腱では、周期的な横紋があるコラーゲン線維の配向組織が観察された。コラーゲン線維の直径は 247 ± 35 nm であった。比較的小さな張力でも継続的に印加することによって架橋が進み、より太い直径のコラーゲン線維が形成されるものと考えられる。

(2) Tendon gel への引張応力印加と形成組織との関係

成熟した tendon gel 試料に、リンガー液内に浸漬した状態で、ワイヤまたは結紮系をつなぎ、張力印加試料を作製した。張力印加条件は、(i) マニピュレーターを用いて10MPaを最大値とする引張応力を単調増加的に印加する(引張速度: 約 $20 \mu\text{m/s}$)、(ii) アクチュエーター(「TD-102」、テクノハズ株式会社)を用いて約0.5MPaのほぼ一定の引張応力(約0.5mmのひずみ)を360回/hのサイクルで10日間にわたって繰り返し印加する、および(iii) デジタルフォースゲージを用いて約0.5MPaのほぼ一定の引張応力(約0.5mmのひずみ)を10日間にわたって静的に印加する。試験後、それぞれの条件下で印加した荷重とコラーゲン線維束の直径との関係性を評価した。

3日目に採取した試料は、張力を印加してもほとんど伸びることなく固定ピンから脱落した。5日目に採取した試料は、張力を印加すると形状が少し細長く変化して紐状組織となったが、コラーゲン線維の配向は観察されなかった。

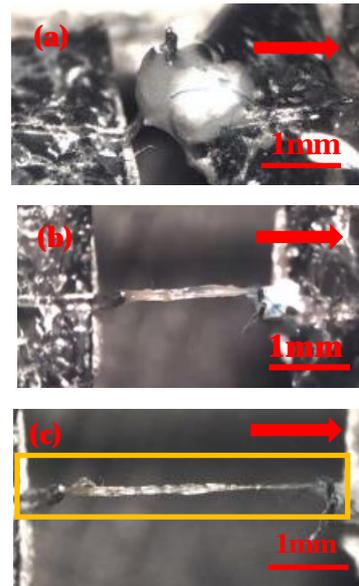


図7 10日目の tendon gel の単純引張試験 (a)引張前、(b)引張過程1、(c)引張過程2

一方、10日目に採取した試料は、図7に示したように、応力の単調増加にともなって紐状に伸び、本実験条件の範囲内では試料は破断することなく伸長した。このとき

の加重 - 変位曲線は、ノコギリの歯状に上下しながら応力値が上昇していく様子を示していた。これは、引張変形に伴う局所的な試料の破断、および金属材料の加工硬化に相当する組織的变化を伴う硬化に起因していると考えられる。組織的变化とは、すなわち、張力印加によるコラーゲン線維同士の間架橋反応の促進と、引張方向へ配向しながら組織が太く成長する変化により、tendon gel 試料の機械的強度が増すことである。本実験で使用した tendon gel の最大応力は約 9.5MPa と求められた。10MPa 程度の張力を継続的に印加することで急速に架橋が進み、コラーゲン線維が配向しながら太く成長するものと考えられる。

紐状に伸びた(図7の(c))組織を光学顕微鏡で観察した結果、光学顕微鏡レベルでも周期的な横紋が観察され、コラーゲン線維束が太く形成されているものと考えられる。観察像から推定されるコラーゲン線維束の直径は約 10 μ m であった。これは通常のマウスのアキレス腱を形成する線維束のおよそ 45 倍の太さに相当する。

試料に印加する応力とコラーゲン線維束の直径との関係を調べた。コラーゲン線維束の直径は、印加する応力の増加に伴ってコラーゲン線維同士の間架橋を始めるため、即座に太くなる。組織の表面を原子間力顕微鏡 (AFM; Veeco Co., Ltd, NY, Dimension 3100, カンチレバー: NCHV-10V, 測定モード: タッピングモード) を用いて観察したところ、応力が約 0.2MPa、約 2.5MPa、約 10MPa のときに、コラーゲン線維束の直径はそれぞれ 54 \pm 20nm、61 \pm 12nm、約 10 μ m である。なお、マウスのアキレス腱では、コラーゲン線維束の直径は 247 \pm 35nm である。この結果はすなわち、tendon gel に印加する張力によって任意にコラーゲン線維束の直径(つまり tendon gel の機械的特性)を制御できることを示している。また、約 10MPa など、比較的大きな引張応力を印加することにより、すでに完成されているマウスのアキレス腱よりも太いコラーゲン線維束を形成することができる。上述したように、tendon gel に対して張力を単調増加的に負荷するとコラーゲン線維は太くなるがゲル組織全体が紐状になる。そこで、前述したような条件により定荷重を繰り返し印加する試験(サイクル試験)と、同じく定荷重を連続的に印加する試験(クリープ試験)において、tendon gel にコラーゲン線維束がどの程度形成されるかを調べた。

張力印加前後では形態を含めてほとんど変化がないように見える。しかしながら、試験後の組織表面を AFM で観察したところ、張力印加方向にコラーゲン線維が強く配向していることが分かる。コラーゲン線維の直径は、約 99.0 \pm 55.4nm であった。

一方、クリープ試験後の試料は、目視ではやはり形態を含めてほとんど変化がない

ようにみえた。しかしながら、原子間力顕微鏡を用いた表面観察では、サイクル試験と比べてコラーゲン線維がより太くかつ広い範囲で配向していることが確認された。コラーゲン線維の直径は、約 208.3 \pm 75.5nm であった ($p < 0.01$, one-way analysis of variance (ANOVA))。

以上の結果をまとめると、繰り返し張力印加(サイクル試験)でも一定張力印加(クリープ試験)でもコラーゲン線維が配向した組織が得られるが、張力を一定期間連続的に印加した方がコラーゲン線維の成長がより進行していたことが明らかとなった。本実験により、腱・靭帯再生においてはクリープ試験による張力印加がより適した方法といえるだろう。

(3) まとめ

本研究では、tendon gel に対して引張試験時の生体組織の変化の観察と FT-IR による構造解析、AFM による表面観察を行った。Tendon gel では生体内での 10 日間の成熟によってプロコラーゲンからコラーゲンペプチドが分裂しコラーゲン分子が完成する。その後、張力の印加によって即座にアルドール縮合型架橋が始まりコラーゲン線維が太く成長し適切な太さの線維束が形成される過程でシッフ塩基型架橋が優位となって腱が再生されるモデルを今回の AFM 観察と IR 測定によって明らかにした。サイクル試験でもクリープ試験でもコラーゲン線維が配向した組織が得られたが、張力を一定期間連続的に印加した方がコラーゲン線維の成長はより進むことを明らかにした。本研究により、tendon gel に対して張力を任意に制御して印加することにより、コラーゲン線維束の太さを制御できる可能性を得た。

<参考文献>

- [1] K. Torigoe, H. F. Tanaka, K. Yonenaga, H. Ohkochi, M. Miyasaka, R. Sato, T. Kuzumaki, K. Yoshida, T. Yoshida, J Orthop Res 29 (2011) 1944-1950
- [2] K. Torigoe, K. Hashimoto, G. Lundborg. Exp Neurol 160 (1999) 99-108
- [3] T. Kuzumaki, Y. Obara, Y. Ishiyama and R. Sato. Diam Relat Master 25 (2012) 1-4
- [4] Molecular Biology of The Cell Bruce Alberts, et.al., Garland Science 2008 年
- [5] コラーゲンの製造と応用展開 監修 谷原正夫 株式会社シーエムシー出版 2009 年

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)

K. Yamazaki, R. Sato, D. Morita, K. Torigoe and T. Kuzumaki, Tensile test and atomic force microscopic analysis on regenerative tendon biomaterial, Proc. of the MJIT-JUC Joint International Symposium 2013, (査読有)

K. Takeuchi, T. Morimoto, T. Kuzumaki, Evaluation of mechanical properties and electrical conductivity of carbon nanotube yarn, Proc. of the MJIT-JUC Joint International Symposium 2013, (査読有)

K. Yamazaki, K. Suzuki, K. Torigoe and T. Kuzumaki, Fourier transform infrared spectroscopy and atomic force microscope observations of regenerative tendon biomaterial, Proc. of the 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, The Journal of Physiological Sciences, 65 (1), 2015, S187, (査読無)

[学会発表](計 13 件)

葛巻徹、くっつける技術コラーゲン線維束を用いた人工腱の形成、B10 tech2013 第 12 回国際バイオテクノロジー展「アカデミックフォーラム 創薬・医療・バイオ研究発表会」、2013 年 5 月 9 日、東京

葛巻徹、鳥越甲順、佐藤正人、アキレス腱再生機構の解明と医療機器への応用展開、イノベーションジャパン 2013 大学見本市、2013 年 8 月 29 日、東京

竹内健人、新井龍一、森本達也、飯島徹、稲垣裕大、林靖彦、葛巻徹、通電加熱したカーボンナノチューブ紡績系の機械的性質と電気伝導性の評価、第 27 回ダイヤモンドシンポジウム、2013 年 11 月 20 日、埼玉

葛巻徹、ナノ材料計測技術の開発とその応用展開、東海大学マイクロ・ナノ啓発会第 2 回学術講演会、2014 年 2 月 25 日、神奈川

山崎勝史、森田大貴、鳥越甲順、葛巻徹、原子間力顕微鏡と顕微赤外分光による再生腱・膠原線維の配向機構の解析、第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 4 日、京都

葛巻徹、鳥越甲順、佐藤正人、膠原繊維の応力誘起自己組織化現象の解明及び人工腱形成法の開発、東海大学総合研究機構プロジェクト研究成果発表会、2014 年 3 月 4 日、神奈川

中込和輝、佐藤匡、飯島徹、稲垣裕大、林靖彦、葛巻徹、通電加熱したカーボンナノチューブ紡績系の機械的性質の評価、第 75 回応用物理学会秋季学術講演会、2014 年 9 月 19 日、北海道

宇都宮円香、松本忠史、葛巻徹、水溶性

コラーゲンの自己組織化を利用したカーボンナノチューブの配列組織制御、第 28 回ダイヤモンドシンポジウム、2014 年 11 月 19 日、東京

山崎勝史、鈴木慶一、鳥越甲順、葛巻徹、原子間力顕微鏡と顕微分光法による再生腱形成の初期過程の解析、第 14 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 20 日、横浜

K. Yamazaki, K. Suzuki, K. Torigoe, T. Kuzumaki, Fourier transform infrared spectroscopy and atomic force microscope observations of regenerative tendon biomaterial, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015 年 3 月 22 日、神戸

K. Nakagome, T. Sato, T. Iijima, Y. Inagaki, Y. Hayashi, T. Kuzumaki, Evaluation of mechanical properties of heat-treated carbon nanotubes yarn, New Diamond and Nano Carbons 2015, 2015 年 5 月 26 日、静岡

佐藤匡、中込和輝、飯島徹、稲垣裕大、林靖彦、葛巻徹、通電加熱したカーボンナノチューブの機械的性質の評価、第 76 回応用物理学会秋季学術講演会、2015 年 9 月 15 日、名古屋

佐藤匡、中込和輝、村山拓哉、飯島徹、稲垣裕大、林靖彦、葛巻徹、通電加熱による CNT 紡績系の引張強度の向上、第 29 回ダイヤモンドシンポジウム、2015 年 11 月 18 日、東京

鈴木慶一、青柳晃司、佐藤匡、鳥越甲順、葛巻徹、生体分泌組織リガメントゲルを用いた人工靭帯の開発、第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月 19 日、大阪

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称：リガメントゲルの産生方法および人工靭帯の作製方法

発明者：葛巻徹、鳥越甲順

権利者：学校法人東海大学

種類：特許権

番号：特願 2015-185442

出願年月日：平成 27 年 9 月 18 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛巻 徹 (KUZUMAKI TORU)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：50396909

(2) 研究分担者

鳥越甲順 (TRIGOE KOHJUN)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：50126603