サケコラーゲンをを用いた再生医療用マトリックスの開発

棟方正信

1. はじめに

一昨年的高分子討論会トピックスのひとつとして取り上げていただいてから、マスコミ取材を受ける機会が増え、とくに昨年はなぜかTVの経済ニュースの特集に取り上げられた。TV取材は「海の厄介者」の利用ということで、昨年大発生した「越前くらげ」とのセットモノであった。筆者らの開発動機は、実は「海の厄介者」の有効利用というより再生医療用の牛皮コラーゲンがBSE問題で使用できなくなり、牛皮コラーゲンに代わるコラーゲンを開発する必要に迫られたことによる。

2. 鮭皮コラーゲンを選んだ理由

筆者らは、牛皮コラーゲン由来のゼラチンスポンジに歯セメント質粒子を包埋した人工歯根膜による歯周組織再生療法の開発を行ってきた。歯セメント質中の再生因子を精製し、人歯セメント質粒子の代わりに包埋することが筆者らの分担で、物質が同定できいざ前臨床というときにBSE問題で牛皮ゼラチンスポンジに代わるバイオマテリアルの開発に迫られた。コラーゲンは、哺乳類のタンパク質の約1/3を占める。したがって牛がだめでも変性温度がヒトコラーゲンより高い豚や鳥由来を使えばよいのだが、口蹄疫、鳥インフルエンザウイルスなどのリスクがある。そこでヒトへの感染が報告されていない魚類ということになるが、魚類コラーゲンは、ゼラチンに変わる温度（変性温度）が低く再生医療用マトリックス（膜やスポンジとして細胞が増殖分化する足場を提供）として使用できない。また再生医療用として開発しても材料が常に安定して供給されなくては、製品化することはできないので、量の確保という観点からも対象を決める必要があった。鮭皮は水産加工場において年間約2.5千トン廃棄されている。この鮭皮にはコラーゲンが多量に含まれており、コラーゲン抽出精製法はすでに開発されていた。ただ変性温度は低く再生医療用

バイオマテリアルとしての価値はなかった。筆者らはこの鮭皮コラーゲンをバイオマテリアルとして開発することにした。

3. 鮭皮コラーゲン変性温度の改良

鮭皮コラーゲンの変性温度は19℃のためヒトに使用可能な変性温度にする必要があり、コラーゲン線維[I型コラーゲンは3本の左巻きペプチド鎖（グリシン-X-Yの繰り返し）が主、分子量約100 kDa: Xはプロリンが主）が右巻きで分子量約300 kDaの超ラセン構造形成]を架橋し変性温度上昇を試みた。架橋法にはいろいろな方法が開発されているが、化学架橋(GA, EDC)、物理的架橋(熱脱水)について検討した。テロペプチドは抗原性を示すためトリプシン処理で切断したアテロコラーゲンについて架橋処理を行い、スポンジを作製し、細胞増殖・分化に対する影響を検討した。併せてスポンジ孔径についても検討した。GA(glutaraldehyde)架橋は強度十分であったが、架橋剤の毒性のため細胞増殖は非常に悪かった。熱脱水は毒性を示さなかったが、架橋率が10%以上とならず強度不十分で、細胞培養液中で崩壊してしまった。ヒト歯周細胞の増殖と分化が優れていたのは、EDC[1-ethyl-3-(3-dimethyl amino-propyl)carbodiimide hydrochloride]架橋で、孔径は細胞に適度の空間を与える90 μmであった。コントロールの牛皮スポンジに比べ鮭皮スポンジのほうが増殖・分化ともに優れていた¹⁾。

4. 線維ゲルの開発

生体内ではコラーゲンは体液を保持した線維ゲル状態で存在している。アテロコラーゲンをいったんゼラチン化させ、ある条件化におくと線維ゲルを再構成する。この現象と架橋とを組合せることにより、変性温度上昇、強度増加ができるのではないかと柚木らは考え²⁾、処理温度、緩衝液、塩濃度などを詳細に検討したところ、変性温度を何と55℃まで高めることに成功した。しかも得られたコラーゲン線維の太さは約70 nmと極細で均一の太さであった。同じ製法でブタコラーゲンについて検討したところ、サケコラーゲン線維ゲルのように均一の極細線維を得ることができなかった(写真1)。この均一極細線維ゲルがなぜ鮭皮コラーゲンで起こるかは非常に興味があり原因を調べたと

MUNEKATA, Masanobu 北海道大学大学院工学研究科生物機能高分子専攻(060-8628札幌市北区北13条西8)・教授、農学博士。1969年北海道大学農学部農芸化学科卒。専門は再生医療工学、細胞工学、サイトカイン、生分解性プラスチック。

Application of Salmon Collagen to the Extracellular Matrix

写真1 サケコラーゲン線維ゲル（左）とブタコラーゲン線維ゲル（右）

写真2 サケコラーゲン線維ゲルの伸縮性（3倍）、易形成（管状）

ころ、コラーゲンの線維化温度と速度とが影響していた。鮭の場合、線維化は4℃、60秒で速やかに起こるため、高濃度の架橋剤存在下でも、架橋が起こると同時に線維化が起こるためと考察した（図1）。変性温度に関与するのはコラーゲンを形成しているヒドロキシプロリンとの説が有力であるが、鮭皮コラーゲンは牛の約60%しかヒドロキシプロリンがない。現在関係を検討中である。

5. おもわぬ物性：コラーゲナーゼ感受性、伸縮性

鮭皮コラーゲンから線維ゲルを作製し、変性温度を55℃と36℃も高めることに成功した。しかもこの製法は思わぬ展開をもたらし、従来のコラーゲンの概念を変える新コラーゲンを創成した。第一に、伸展して増殖する線維芽細胞に対する増殖および分化活性が、従来の牛や豚コラーゲンより1.5倍優れていたことである。第二に、コラーゲナーゼ感受性が高いため、サケコラーゲン線維ゲル上で培養した細胞シートを、細胞が分泌した細胞外マトリックスを破壊することなくそっくりはく離することができることである³⁾。細胞シート作製法としては岡野らの温度感受性プラスチックではなく離法⁴⁾が有名で、サケコラーゲン線維ゲルを用いる永井らの方法は2番目ということになるが、すべての動物細胞が生体内で担体としているコラーゲン上で培養でき、シートが得られるという点では画期的といえる。コラーゲナーゼ感受性が、従来の牛や豚のコラーゲンより高くなった原因のひとつに極細線維と

図1 線維化と架橋の関係：線維化と架橋の相乗効果を与える最適条件が存在：鮭アテロコラーゲンではEDC 60mM (4℃)

細胞接着班の関係があると考えられるが、詳細は今後の検討課題である。第三の驚きは、熱処理した線維ゲルは3倍伸び、しかも元に戻る現象を示したことである（写真2）。伸縮する熱処理線維ゲル上で細胞は増殖することが可能であり、伸展培養用担体（伸展方向に細胞が並び方向性をもった細胞シートの作製が可能）、人工血管、靱帯などへの開発が考えられる。

6. おわりに

研究し尽くされた感のあるコラーゲンの分野でブレークスルーを体験できた。再生医療用バイオマテリアルは実際に臨床に使用されなければ意味がなく、臨床医との共同研究を行っている。鮭線維ゲル人工歯根膜の犬への短期埋め込み試験の結果では、「異常なし」との結果を得ている。そのほか鮭白子DNAとの複合材開発（細胞接着班制御）、変性温度がヒトに近いテラピアウロココラーゲンについても共同研究を進めており、マリンコラーゲンをベースとした、物性、細胞増殖・分化を再生目的に合わせて自由に制御できるマトリックスを作製する研究を続けている。

文 献

- 1) N. Nagai, et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 389 (2004)
- 2) S. Yunoki, et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 40 (2004)
- 3) N. Nagai, et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 493 (2004)
- 4) T. Shimizu, T. Okano, et al.: *Circ. Res.*, **90**, e40 (2002)