

# 軟骨の増殖能を維持してプロテオ グリカン産生能を促進する人工コ ラーゲン水溶液とスカフォールド

千葉大学大学院医学研究院整形外科学  
鈴木昌彦

# 背景

- コラーゲンはアミノ酸が連なった分子が3本縘りあわされた3重らせん構造を有した体を構成する代表的なタンパク質です。
- 天然のコラーゲンが化粧品などをはじめとして多くの用途で使用されてきましたが、狂牛病などの原因となる病原体が明らかになり動物由来コラーゲンの安全性に疑いがでてきました。

Kisihimoto T, etc. Biopolymers, 79(3), 163-172 (2005)

Synthesis of Poly(Pro-Hyp-Gly)<sub>n</sub> by Direct

Polycondensation of (Pro-Hyp-Gly)<sub>n</sub>, Where n = 1, 5, and 10, and Stability of the Triple-Helical Structure

- コラーゲンに特徴的なアミノ酸であるプロリン、ヒドロキシプリン、グリシンを繰り返すつないでコラーゲンと同じ機能を持つ新規材料を作製しました。

# 人工コラーゲンの特徴

- アレルゲン(抗原性)なし  
皮膚感作性試験  
皮膚一時刺激性試験  
皮膚累積刺激性試験  
眼粘膜刺激性試験  
単回経口毒性試験  
細胞毒性試験  
短期皮下埋植試験 などで問題はありませんでした。
- 熱安定性に優れています。
- 無臭です。

# 変形性関節症や関節リウマチの軟骨変性 に対する保存的治療

生体の関節液中にはヒアルロン酸が存在します。

このヒアルロン酸成分を鶏冠から抽出したり、発酵生産により製造して膝関節内に週1回(5週間)関節内注射を行う治療方法が広く行われています。

# 軟骨障害に対する手術治療について

外傷による骨軟骨欠損、骨壊死による骨軟骨損傷、変形性関節症による軟骨変性に対して、

正常な硝子軟骨へ修復する治療法が検討されています。

軟骨欠損の修復の方法には、

- マイクロフラクチャー法、
- 自家骨軟骨柱移植術（モザイクプラスチック）、
- 自家培養軟骨移植術などがあります。

自家培養軟骨移植では体外で軟骨細胞を培養して scaffold に入れて生体内に戻すことが行われています。

# 本研究の目的

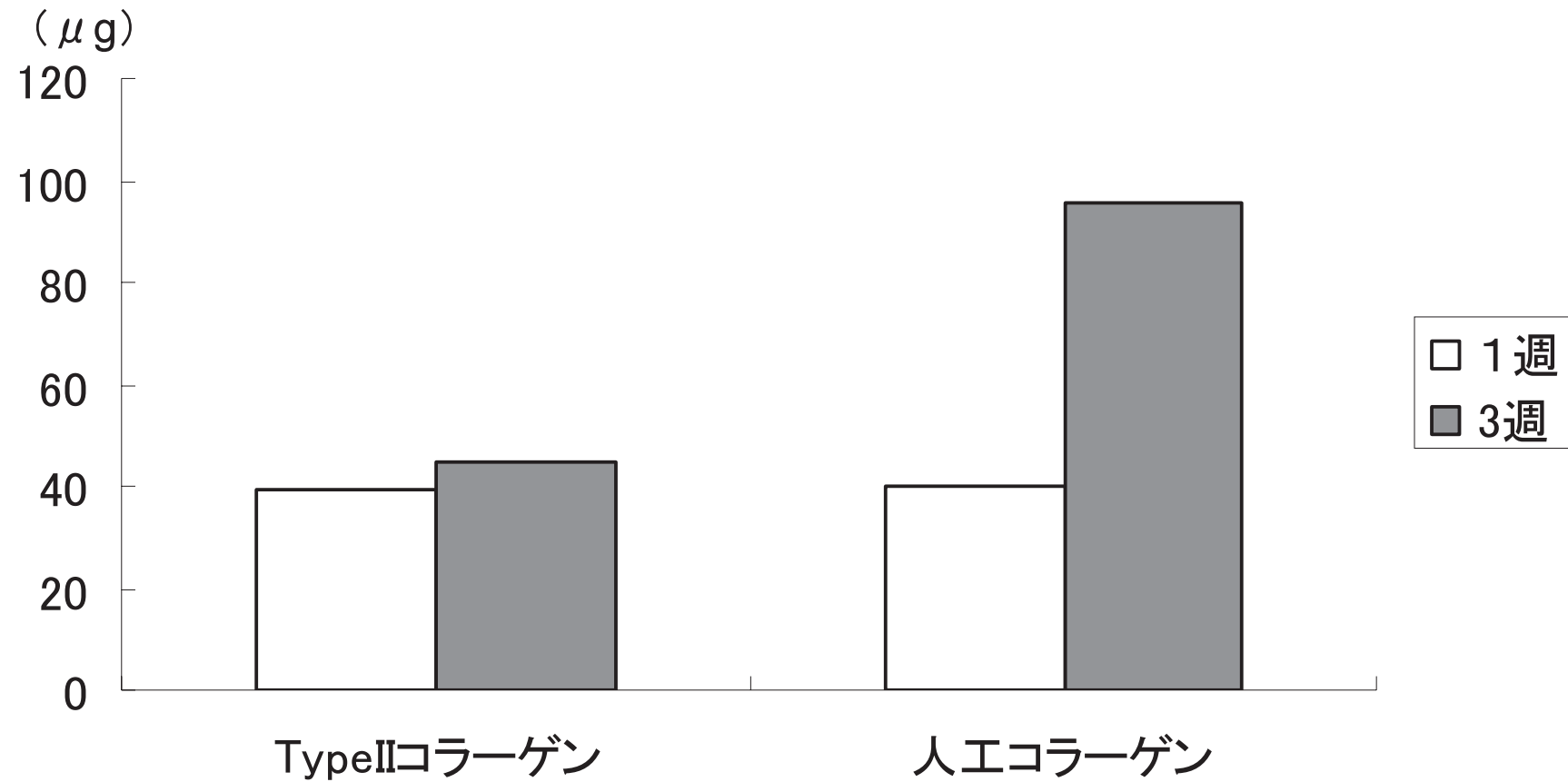
- 人工コラーゲンの軟骨細胞に対する影響は今まで調べられていませんでした。そこで我々は、人工コラーゲン水溶液、人工コラーゲンで作製したscaffoldを用いて軟骨細胞に対する効果を検討しました。

# 実験方法1

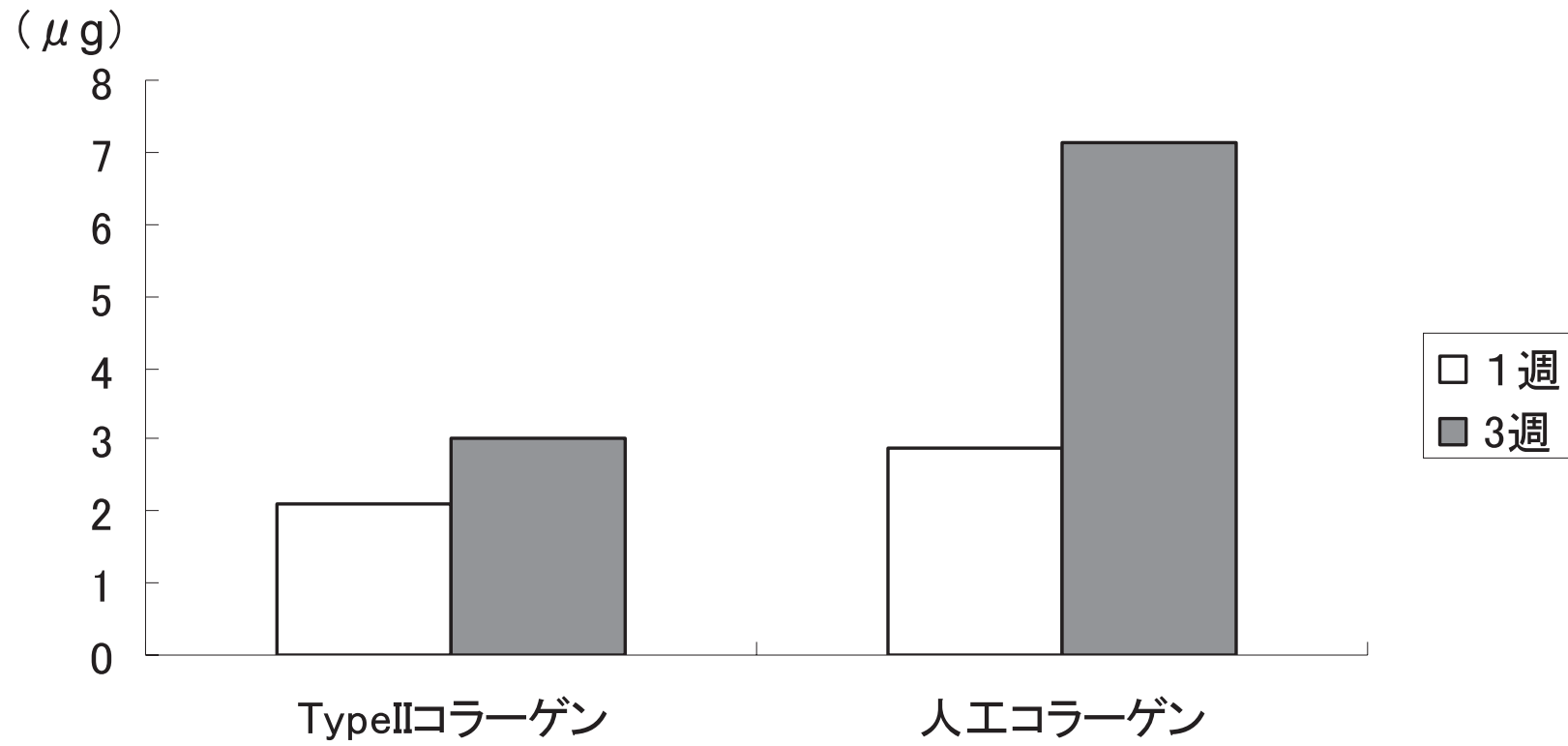
- New Zealand white rabbit、雄性、8-9週 5匹の肩関節、膝関節を摘出し、メスで軟骨層のみを削って採取しました。0.4% pronaseと0.025% collagenaseを添加して37°Cでインキュベーションして軟骨細胞を分離しました。
- 人工コラーゲンスポンジ(10 mm x 5 mm x 7 mm)を24 wellの培養トレイの1 wellに1個ずつ貼り付けてethylene oxide gas滅菌を行いました。40  $\mu$ l中に $5 \times 10^5$  cellsの細胞を含むように調整して人工コラーゲンスポンジ内に注射しました。
- コントロールとして、新田ゼラチン製ウシType IIコラーゲン(2%)を24 wellに2 mlずつ入れ凍結乾燥してethylene oxide gas滅菌を行いました。1ml中に $5 \times 10^5$  cellsの細胞を含むように調整して播きました。
- 1週と3週でサンプルを回収してDNA量(ヘキストダイによる定量)とプロテオグリカン含有量(DMMB法)を測定しました。



# プロテオグリカン量



# DNA量

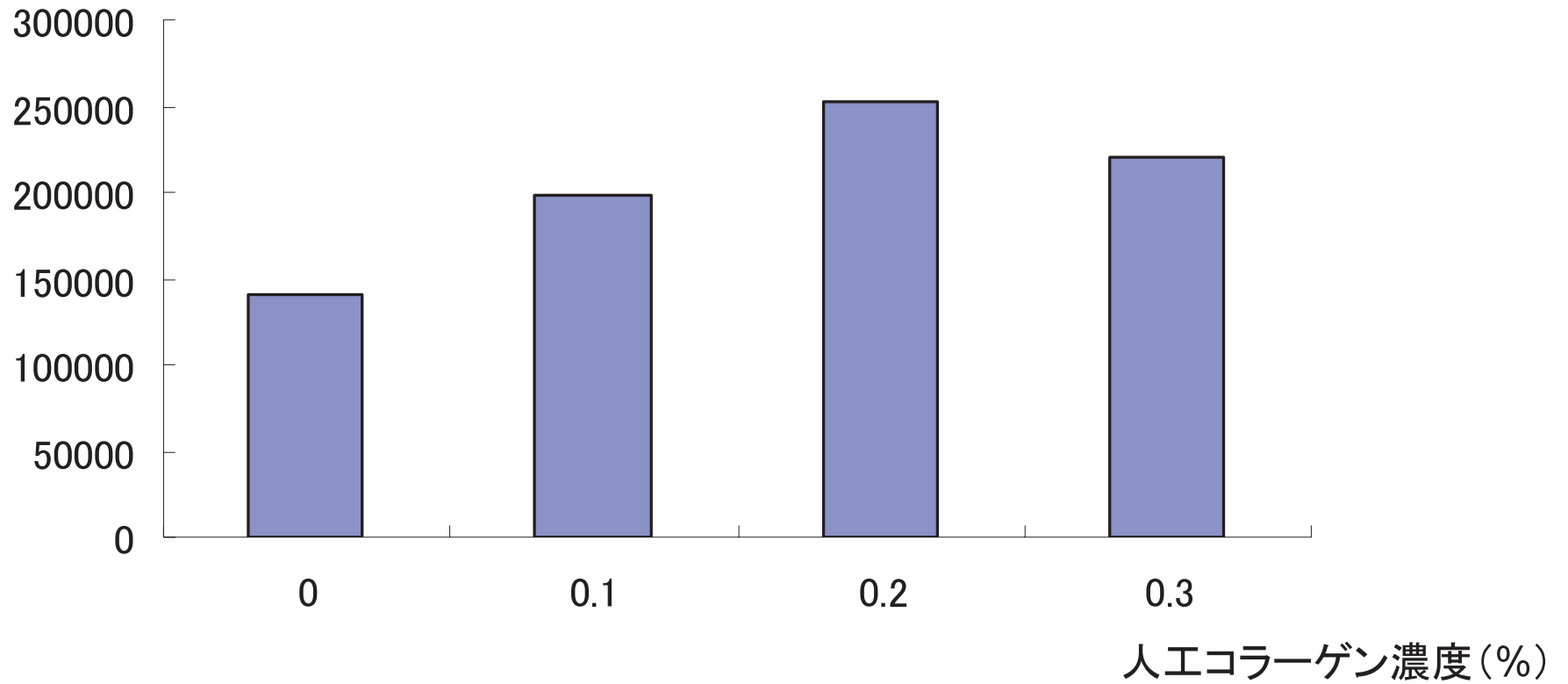


## 実験方法2

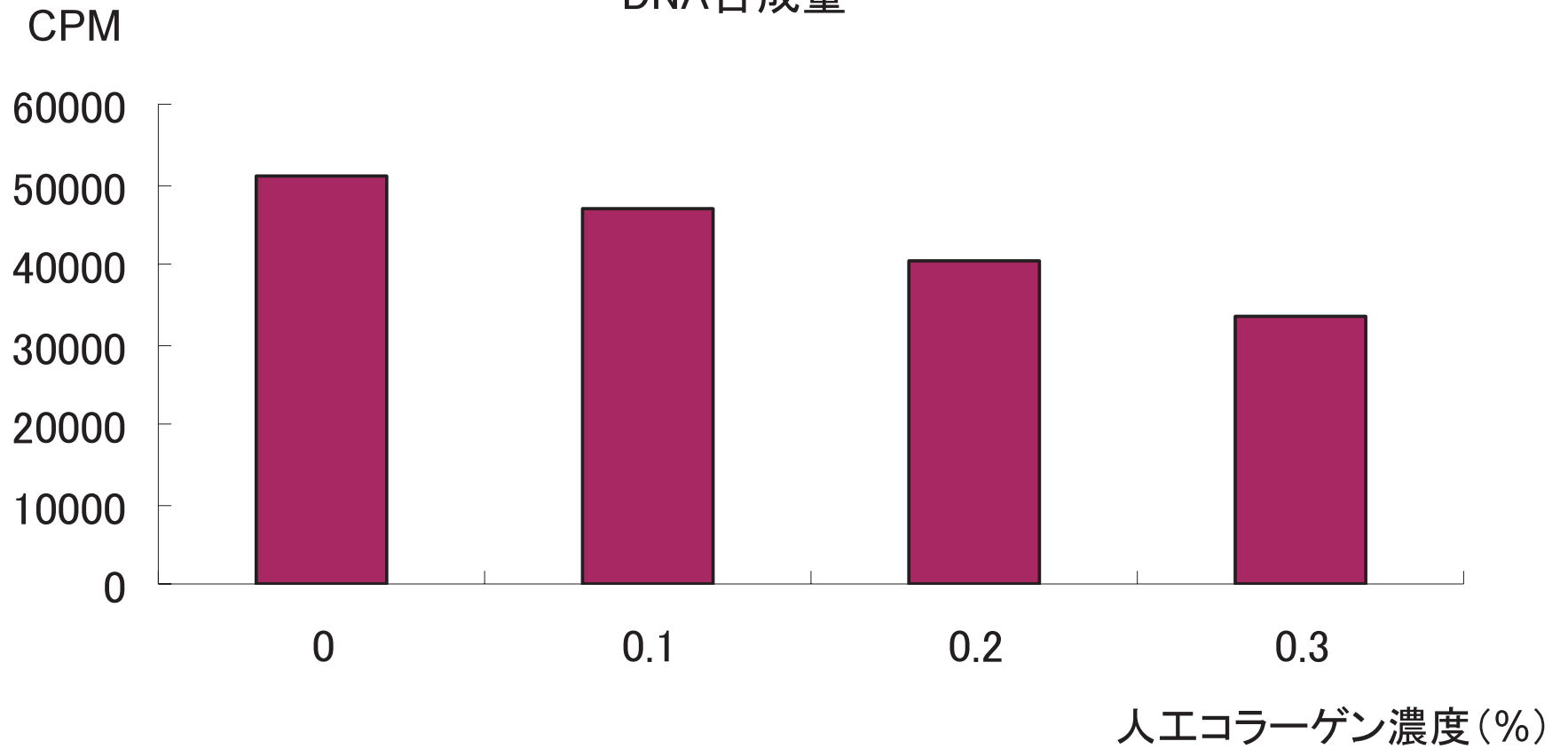
- 軟骨細胞を培養開始24時間後において、人工コラーゲン水溶液を0,0.1,0.2,0.3%に調整した培養液に交換し、7日間作用させ、最後の24時間は更に10  $\mu$  Ci/ml Na<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>を添加して培養を行いました。
- PD-10 pre-packed column(GEヘルスケアバイオサイエンス)を用いてサンプルを分取した後に液体シンチレーションカウンターで放射能含有量(cpm)を測定しました。また、この際用いたサンプルのDNA量をHoechst 33258 dyeにより測定し、cpm/mg DNA値を求めました。
- 軟骨細胞を培養開始24時間後において人工コラーゲン水溶液を0,0.1,0.2,0.3, %に調整した培養液に交換し、24時間作用させました。最後の4時間はさらに1  $\mu$  Ci/ml [methyl-3H] Thymidineを添加して培養を行いました。上記培養終了後、細胞を回収して液体シンチレーションカウンターで放射能含有量(cpm)を測定しました。

# プロテオグリカン産生量

プロテオグリカン産生量  
CPM/DNA(mg)



# DNA合成量



# 新技術の特徴

- 軟骨細胞でプロテオグリカン産生を亢進させる物質には fibroblast growth factor などがあるが、遺伝子工学的な手法で作製することから高価であること、生体内への安全性に問題がありました。
- 人工コラーゲン scaffold と人工コラーゲン水溶液は軟骨細胞のプロテオグリカン産生能を促進させました。
- 人工コラーゲンは抗原性がなく大量生産が可能でありコスト削減が可能であることから、軟骨損傷や軟骨変性に対する治療に使用することが期待できます。

# 想定される用途

- 本技術は自家軟骨培養移植術を行う場合に軟骨細胞を移植するためのscaffoldとして使用可能です。
- 移植用の軟骨を培養するときに人工コラーゲンを添加することでプロテオグリカンの産生を増大させて成熟した軟骨を提供できます。
- 変形性関節症や関節リウマチの関節に、ヒアルロン酸と人工コラーゲンを混ぜて注射することで軟骨の修復が期待できます。

# 想定される業界

## 利用者

- 軟骨移植を提供している会社
- ヒアルロン酸製剤を販売している製薬会社

## 市場希望

- ヒアルロン酸製剤の市場は日本国内で1000億以上



# 実用化に向けた課題

- 現在、兎の関節内に人工コラーゲンを注射する実験を行っています。
- 人工コラーゲンの至適濃度に関して検討する必要があります。
- 今後医薬品として実用化するには臨床試験が必要となります。

# 企業への期待

- ヒアルロン酸製剤を販売している企業との共同研究を希望します。

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称： 軟骨の増殖能を維持してプロテオグリカン産生能を促進する人工コラーゲン水溶液とスカフォールド
- 出願番号： 特願2009-112217
- 出願人： 千葉大学
- 発明者： 鈴木昌彦、上野光一、武藤奈々美

# お問い合わせ先

**千葉大学産学連携・知的財産機構**

**産学官連携コーディネーター 阿草 一男**

**TEL 043-290-3565**

**FAX 043-290-3519**

**e-mail [agusa@faculty.chiba-u.jp](mailto:agusa@faculty.chiba-u.jp)**