

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03021

研究課題名(和文) 再生骨軟骨組織のラマンプロファイリングに基づく次世代骨軟骨再生技術の創成

研究課題名(英文) Development of next-generation technologies for bone-cartilage regeneration on the basis of Raman profiling for regenerated bones and cartilages

研究代表者

山本 雅哉 (Yamamoto, Masaya)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：10332735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：次世代骨軟骨再生技術を研究開発するため、再生された骨や軟骨組織に対する分析技術として、ラマン分光法を利用した判別方法に関する研究を行った。すなわち、骨髄間葉系幹細胞を利用した細胞凝集体、iPS細胞からなる細胞凝集体、関節軟骨や骨組織ができる過程のマウス胎児、軟骨再生のための脱細胞化軟骨足場材料など、骨や軟骨組織に対する次世代の再生誘導技術として研究されている対象物に対して、ラマン分光法による分析が可能であることを明らかにした。さらに、様々な骨、軟骨再生に応用可能な生体材料に関する研究を行い、細胞培養において、間葉系幹細胞に対して骨分化を効率よく誘導できる生体機能性ハイドロゲルを開発した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to develop an analysis technique on the basis of Raman spectroscopy to discriminate the type of cartilage tissues regenerated by emerging new technologies to be applied for regenerative medicine, such as mesenchymal stem cell aggregates, iPS cell aggregates, developing osteochondral tissue of embryos, decellularized cartilages. We found that Raman spectroscopy can be applied for the regenerated bones and cartilages. In addition, several researches have been carried out to develop biofunctional hydrogels that allows us to induce efficient osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells in culture.

研究分野：再生医工学

キーワード：再生医療 生体材料 分析科学

1. 研究開始当初の背景

研究開発当初、研究代表者は、種々の骨軟骨再生技術を開発し、その一部を臨床応用しつつあった。これらの研究を通じて、研究代表者らは、骨軟骨再生には、少なくとも以下の2点を考慮しなければならないということに着想した。すなわち、大きな欠損や放射線治療後の骨軟骨組織を再生する場合、間葉系幹細胞などの細胞が必要不可欠であること、軟骨は、体の部位特異的に硝子軟骨(関節など)、線維軟骨(椎間板など)、弾性軟骨(耳など)があり、それらを区別して再生する必要があること、これら2点である。

第1点目については、細胞を大量に調製し、細胞培養足場と組み合わせる必要がある。第2点目については、軟骨を構成するコラーゲン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックスが部位特異的に異なるため、それらを判別する必要がある。具体的には、培養した再生骨軟骨組織に対して治療前に細胞外マトリックスを調べる必要がある。しかし、従来法では、分析のために生体組織が破壊されてしまうため、治療に用いる再生骨軟骨組織に対して行うことができないという問題があった。このため、侵襲が低く、成分を推定するために必要となるスペクトルを得ることが可能なラマン分光法を利用することを考えた。

研究開始当初、国内外で行われている骨軟骨再生に関する研究は、再生技術の開発に限定され、再生骨軟骨組織に対する非破壊的評価技術の開発は皆無であった。このため、ラマンプロファイリングに基づいて、再生骨軟骨組織を迅速かつ非破壊的に分析することにより、骨軟骨再生技術を最適化する試みは、部位特異的な軟骨再生を可能とする次世代骨軟骨再生技術の創成につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞単独ではなく細胞集合体を利用する、ならびに非破壊的な判別分析法であるラマンプロファイリングを利用することによって、研究開始当初に想定した問題の解決を図ることである。具体的には、細胞の生存率を改善した生体吸収性微粒子を含んだ細胞集合体、あるいはマイクロチップを用いて作製した均質な細胞集合体を用いた。

一方、癌組織の迅速診断装置として開発されていたラマンプロファイリング法を再生医療へ応用することを試みた。すなわち、関節軟骨や骨組織ができてくる過程のマウス新生児、軟骨再生のための脱細胞化足場材料、iPS細胞からなる細胞凝集体、骨髄間葉系幹細胞を利用した細胞凝集体など、骨や軟骨組織に対する次世代の再生誘導技術として研究されている対象物に対して、ラマン分光法による分析を行った。さらに、様々な骨、軟

骨再生に応用可能な生体材料に関する研究として、細胞培養において、間葉系幹細胞に対して骨分化を効率よく誘導できる生体機能性ハイドロゲルについて研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 部位の異なる軟骨組織に対するラマンプロファイリング

ウサギ(New Zealand white rabbit、オス、体重3kg以上)の膝関節、ならびに耳から、関節軟骨、半月板、ならびに耳介軟骨をそれぞれ採取した。得られた軟骨組織について、凍結切片(厚み50 μ m)を作製し、フッ化カルシウム硝子基板(シグマ光機社製、低散乱・平行平面基板)にのせた。得られた軟骨組織薄片を蒸留水で洗浄後、共焦点ラマン分光顕微鏡(レニショー株式会社製、inViaラマン顕微鏡)を用いて、レーザー波長785nm、90mW、露光時間10sec、空間分解能1.0 μ mの条件でラマンスペクトルを測定した。

(2) 再生医療への応用を指向したラマンプロファイリング

上述した方法に基づき、再生医療に関連した以下のサンプルについて、ラマンスペクトルを測定した。すなわち、骨軟骨組織形成過程のマウス新生児膝関節組織、ブタ半月板の脱細胞化足場材料、iPS細胞からなる細胞凝集体である。いずれのサンプルについても、凍結切片(厚み50 μ m)を作製し、フッ化カルシウム硝子基板にのせて測定した。

(3) 間葉系幹細胞の骨分化誘導のための生体機能性ハイドロゲル

ポリアクリルアミドハイドロゲルの表面に細胞シグナル分子を固定化することにより、生体機能性ハイドロゲルを作製した。

まず、アクリルアミド、および*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(BIS)の混合モル比を変化させることにより、架橋度が異なるポリアクリルアミド(PAAm)ハイドロゲルを作製した。得られたPAAmハイドロゲルに対して細胞接着性を付与するために、ハイドロゲル表面にrat tail collagen type Iを固定化した。

次に、骨分化誘導のための生体機能性を付与するために、得られたハイドロゲルの表面に ephrinB2 を配向固定化した。ここで、ephrinB2 を配向固定化するために、protein A と IgG 抗体の Fc ドメインとの特異的相互作用を利用した。すなわち、IgG 抗体の Fc ドメインと特異的に相互作用する protein A を固定化したハイドロゲル表面に対して、ephrinB2 と Fc ドメインとの融合タンパク質(ephrinB2-Fc) を特異的に相互作用させることにより、ephrinB2 配向固定化ハイドロゲルを得た。得られた生体機能性ハイドロゲル上でヒト不死化間葉系幹細胞を培養し、Runx2 に対するリアルタイム PCR により骨分

化を評価した。さらに、生体機能性ハイドロゲルを用いて、間葉系幹細胞を上下からはさみこむサンドイッチ培養法（図1）についても検討した。

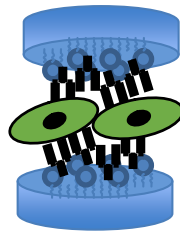


図1 生体機能性ハイドロゲルで細胞の上下をはさみこむサンドイッチ培養法

4. 研究成果

(1) 部位の異なる軟骨組織に対するラマンプロファイリング

軟骨組織片に対する共焦点ラマン分光測定により、軟骨組織片にダメージを与えることなくラマンスペクトルを得ることができた。図2に得られたラマンスペクトルに対して多変量解析を行った結果を示す。

関節軟骨(硝子軟骨)

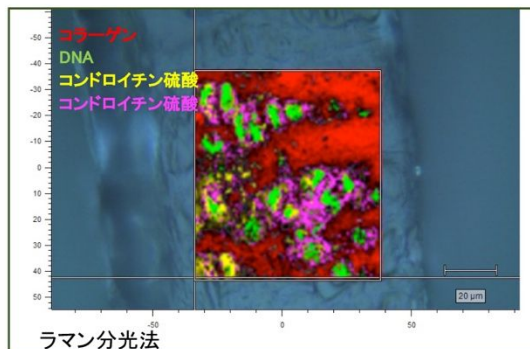


図2 関節軟骨から得られたラマンスペクトルに対する多変量解析

図から明らかなように、多変量解析を行うことにより、従来法であるアルシアンブルー染色と比較して、コラーゲン、DNA(細胞核)、コンドロイチン硫酸を同定することができ

た。他の軟骨組織についても、同様に行うことができた(データ省略)。次に、これらの多変量解析の結果を比較することにより、軟骨組織の判別について検討した(図3)。図から明らかなように、多変量解析を行うことにより、硝子軟骨に分類される関節軟骨、線維軟骨に分類される半月板、ならびに弾性軟骨に分類される耳介軟骨を、それぞれ区別することができた。

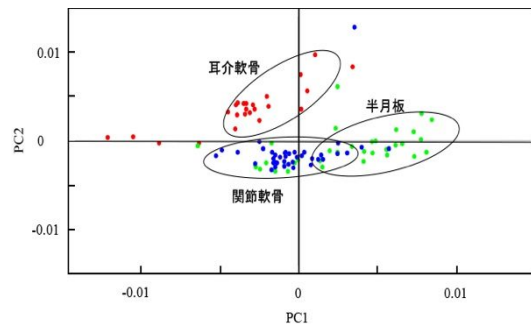


図3 タイプの異なる軟骨組織から得られたラマンスペクトルに対する多変量解析

(2) 再生医療への応用を指向したラマンプロファイリング

図4は、マウス新生児関節軟骨から得られたラマンスペクトルに基づき、多変量解析を行った結果を示す。図から明らかなように、生後5日から7日にかけて軟骨組織の骨化(リン酸カルシウムの沈着)が進み、それに応じてラマンスペクトルが変化することがわかった。さらに、それらのスペクトル変化に基づき、骨化の過程を判別することもできた。

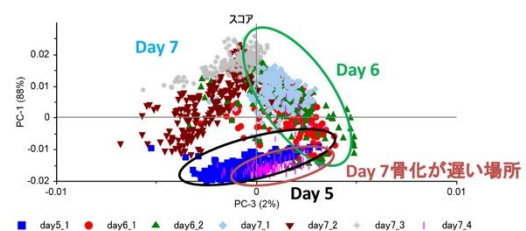


図4 マウス新生児関節軟骨から得られたラマンスペクトルに対する多変量解析

iPS細胞からなる細胞凝集体を軟骨分化誘導後、作製した凍結切片を用いてラマンスペクトルを測定した。図5はiPS細胞からなる細胞凝集体の軟骨分化誘導後に得られたラマンスペクトルを示す。1000 cm⁻¹付近にフェニルアラニンに由来するピークがあり、タンパク質が同定された。細胞外マトリックス分子であることが推定できるが、この分子を特定することはできなかった。

ブタ半月板の脱細胞化足場材料から得られたラマンスペクトルに対して、多変量解析

による主成分分析を行ったところ、脱細胞化処理前後で変化する成分が存在することがわかった(データ省略)。一方、脱細胞化処理により、細胞を含め、多くの成分が変化するため、この変化した成分の同定には、さらなる検討が必要なることが示唆された。

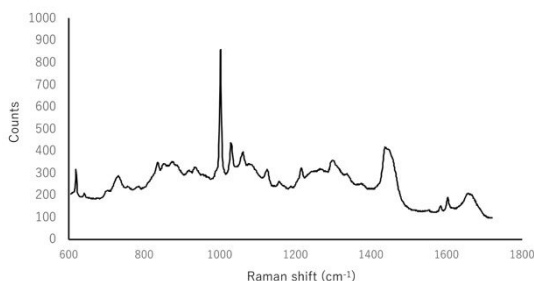


図5 軟骨分化誘導後のiPS細胞からなる細胞凝集体のラマンスペクトル

(3) 間葉系幹細胞の骨分化誘導のための生体機能性ハイドロゲル

ephrinB2を配向固定化した生体機能性ハイドロゲル上で間葉系幹細胞を培養した。その結果、Runx2遺伝子発現の上昇とRhoAタンパク質の発現低下とがよい相関を示した(データ省略)。ここで、RhoAタンパク質は、細胞骨格の一つであるアクチンの形成に関与しているが、ephrin-Ephシグナルによって、その発現が低下することが知られている。これらの結果は、ephrinB2を配向固定化し生体機能性ハイドロゲル上では、Ephシグナルの下流にあるRhoAシグナルが関与して、Runx2の発現が誘導されたことを示している。

最後にephrinB2配向固定化生体機能性ハイドロゲルを用いて間葉系幹細胞を上下で挟み込んだサンドイッチ培養を行った。その結果、間葉系幹細胞の下部、あるいは上部にハイドロゲルがあることで、間葉系幹細胞の骨分化が促進されることがわかった(図6)。

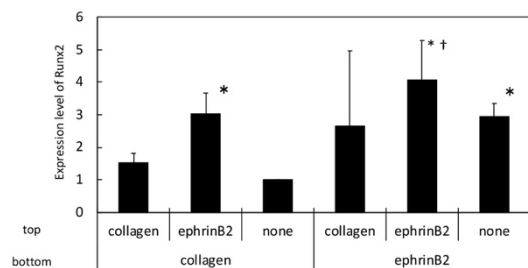


図6 生体機能性ハイドロゲルを用いてサンドイッチ培養した間葉系幹細胞のRunx2発現(培養5日後)

* $p < 0.05$: コラーゲンのみに対して有意差あり

† $p < 0.05$: コラーゲンのみでサンドイッチ培養した群に対して有意差あり

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)(以下すべて査読有)

1. 山本雅哉, 戸田裕之, 田畑泰彦, 三元細胞培養環境としての生体機能性ヒドロゲルを用いたサンドイッチ培養に関する研究. 高分子論文集, 75, 23-31 (2018) doi: 10.1295/koron.2017-0067
2. H. Toda, M. Yamamoto, H. Uyama, Y. Tabata, Effect of hydrogel elasticity and ephrinB2-immobilized manner on Runx2 expression of human mesenchymal stem cells. Acta Biomater., 58, 312-322 (2017) doi: 10.1016/j.actbio.2017.03.016
3. H. Toda, M. Yamamoto, H. Uyama, Y. Tabata, Fabrication of hydrogels with elasticity changed by alkaline phosphatase for stem cell culture. Acta Biomater., 29, 251-227 (2016) doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.036

[学会発表](計17件)

1. 山本雅哉, 再生医療・疾患研究のための生体機能性ハイドロゲルの設計, バイオマテリアル研究 東北地区交流会, 2017年, (招待講演)
2. M. Yamamoto, T. Nishimoto, Y. Tabata, Raman spectroscopic tissue characterization of rabbit cartilages with different tissue types, TERMIS-AP, 2017年, (国際会議)
3. M. Yamamoto, Design for in vitro cellular microenvironments by using bio-functional hydrogels, AUSBME, 2016年, (招待講演)
4. M. Yamamoto, H. Toda, Y. Tabata, Sandwich culture of human mesenchymal stem cells with ephrinB2 oriented-immobilized polyacrylamide hydrogels, Biointerfaces International, 2016年, (国際会議)
5. M. Yamamoto, H. Toda, Y. Tabata, Sandwich culture of mesenchymal stem cells between bio-functional hydrogels as a novel 3-D culture method for regulating their osteoblastic differentiation, 10th World Biomaterials Congress, 2016年, (国際会議)
6. M Yamamoto, H. Toda, Y. Tabata, Novel

3-D culture technique based on sandwich culture between bio-functional hydrogels for enhancing osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells, International Conference on Regenerative Biomedical Materials, 2015年, (招待講演)

7. M. Yamamoto, Design of functional hydrogels for creating artificial extracellular microenvironments in vitro, International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 2015年, (招待講演)
8. M. Yamamoto, H. Toda, Y. Tabata, Sandwich culture with bio-functional hydrogels as a three-dimensional culture technique to induce osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells, 5th Asian Biomaterials Congress, 2015年, (国際会議)
9. M. Yamamoto, H. Toda, Y. Tabata, Sandwich culture with bio-functional hydrogels as a three-dimensional culture technique to induce osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells, TERMIS World Congress, 2015年, (国際会議)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等：該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 雅哉 (YAMAMOTO, Masaya)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：10332735

(2)研究分担者

吉本 敬太郎 (YOSHIMOTO, Keitaro)
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号：60392172

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50211371

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
該当なし